

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Vegetal**



**Ciências**  
**ULisboa**

**Identificação, deteção e caracterização de  
contaminantes em produção de microalgas através de  
técnicas de biologia molecular**

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Maria Margarida Santos Duarte

Dissertação orientada por:  
Professora Dra. Lélia Mariana Marcão Chambel  
Dr. Luis Tiago Marques Guerra

2015



**Identificação, deteção e caracterização de  
contaminantes em produção de microalgas através de  
técnicas de biologia molecular**

Maria Margarida Santos Duarte

2015

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado na empresa A4F, AlgaFuel S.A sob a orientação direta do Dr. Luis Tiago Marques Guerra no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

# AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem o suporte e conselhos de várias pessoas.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer o apoio incondicional e todo o suporte dado por parte da Administração da A4F, AlgaFuel S.A, na realização e desenvolvimento desta tese de Mestrado.

Agradecer ao Tiago Guerra não só a sua orientação, como também o seu tempo, *know-how* e dedicação dada durante o desenvolvimento desta tese.

À Professora Doutora Lélia Chambel quero agradecer-lhe a sua importante orientação neste trabalho. O seu total apoio e dedicação foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho. Agradecer-lhe, ainda, todas as reuniões, conversas e ensinamentos que serão cruciais ao longo do meu desenvolvimento profissional.

Quero também agradecer aos meus colegas de equipa da A4F toda a força e paciência durante este percurso: Vanessa, Teresa, Melissa, Marta, Duarte, Rui, Hugo, Nuno, Celina, Bernardo, Catarina, Pedro, Sara, Diana, Luis e todos os restantes colegas.

Agradecer aos meus amigos de mestrado, Hélder, Inês, Joana, Bruno e Diogo pela amizade, companheirismo, força, conselhos e animação.

Obrigada aos amigos de sempre que me apoiaram e que, mesmo distantes, conseguiram-me enviar boas energias.

Um muito obrigada à minha pequena mas ENORME família por todo o amor que me deram. À minha prima, a sua irmandade e amizade. Às minhas tias, tio, afilhado e à minha sempre jovem avó. Um obrigada enorme aos meus pais, a quem devo tudo.

Ao Valter, obrigada por seres quem és, por todo o amor, força, amizade e pensamento positivo que sempre me transmitiste, acreditando sempre em mim.



---

# Índice

---

Índice de abreviaturas.....	v
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract .....	xi
Motivação.....	- 1 -
1. Introdução.....	- 3 -
<b>1.1. Cianobactérias</b> .....	- 3 -
<b>1.2. Cianotoxinas</b> .....	- 5 -
1.2.1. Microcistinas.....	- 8 -
<b>1.3. Ocorrência de cianobactérias em Portugal</b> .....	- 10 -
<b>1.4. Identificação e deteção de cianobactérias e suas toxinas</b> .....	- 12 -
1.4.1. Observação microscópica .....	- 12 -
1.4.2. Métodos moleculares.....	- 12 -
1.4.3. Deteção imunológica.....	- 13 -
<b>1.5. Objetivos</b> .....	- 15 -
2. Materiais e Métodos.....	- 16 -
<b>2.1. Amostras de cianobactérias</b> .....	- 16 -
<b>2.2. Identificação morfológica</b> .....	- 18 -
<b>2.3. Métodos moleculares</b> .....	- 18 -
2.3.1. Extração de DNA.....	- 18 -
2.3.2. Amplificação por PCR.....	- 19 -
<b>2.4. Determinação do limite de deteção da observação microscópica e da amplificação por PCR</b> .....	- 21 -
<b>2.5. Análise ELISA</b> .....	- 21 -
3. Resultados.....	- 22 -
<b>3.1. Identificação morfológica</b> .....	- 23 -
3.1.1. Amostras ambientais.....	- 24 -
3.1.2. Amostras de culturas de microalgas em produção .....	- 27 -
3.1.3. Amostras liofilizadas (produto final).....	- 28 -
<b>3.2. Deteção por PCR</b> .....	- 30 -
3.2.1. Amostras ambientais.....	- 30 -
3.2.2. Amostras de culturas de microalgas em produção .....	- 31 -
3.2.3. Amostras liofilizadas (produto final).....	- 34 -

<b>3.3. Determinação do limite de detecção da observação microscópica e da amplificação por PCR .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>3.4. ELISA .....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>3.5. Sumário dos resultados .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>4. Discussão e Conclusão .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>5. Referências bibliográficas .....</b>	<b>- 44 -</b>

## **Índice de abreviaturas**

ADDA - 3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid  
ALA – Alanina  
Asp- Aspartato  
bp – base pairs (pares de bases)  
DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais  
FISH - Fluorescence in situ hybridization  
GC-MS - Gas chromatography–mass spectrometry  
Glu- Glutamina  
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography  
HPLC-UV - High-performance liquid chromatography Ultravioleta  
HPLC-PDA - High-performance liquid chromatography photo-diode array  
HPLC-FLD - High Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Fluorescence Derivatization  
IAPMEI - Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação  
MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry  
MC - Microcistina  
MC-LR – Microcistina- Leucina & Arginina  
MC-RR – Microcistina- Arginina & Arginina  
MC-YR – Microcistina- Tirosina & Arginina  
MC-LA – Microcistina- Leucina & Alanina  
MC-Hilr – Microcistina- Hilr  
MC-FR – Microcistina Fenilalanina & Arginina  
MC-WR – Microcistina Triptofano & Arginina  
Mdha - Methyldehydroalanine  
MeAsp -  $\beta$ -erythromethyl-aspartic acid  
PBR – Photobioreactor (fotobioreactor)  
PCR – Polimerase Chain Reaction  
PP1 – Proteína Fosfatase Enzimática Tipo 1  
PP2 – Proteína Fosfatase Enzimática Tipo 2  
qPCR- Quantitative real-time PCR  
RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA  
STX – Saxitoxina  
T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism  
UV – Radiação ultravioleta  
WHO – World Health Organization

## **Abreviaturas dos nomes de géneros:**

*A.* – *Aphanizomenon*  
*C.* – *Cylindrospermopsis*  
*M.* – *Microcystis*  
*N.* – *Nostoc*  
*P.* – *Planktothrix*

## Índice de Figuras

Figura 1 – Diferentes formas morfológicas do grupo das cianobactérias.....	3 -
Figura 2 – Heterocisto (verde) de <i>Anabaena</i> sp. ....	5 -
Figura 3 – Características principais das cianotoxinas .....	6 -
Figura 4 – Estruturas das diferentes variantes de microcistinas (extraída de Lee <i>et al.</i> , 2000) .....	8 -
Figura 5 – Diagrama da árvore de decisão para a monitorização de culturas de microalgas produzidas à escala industrial.....	22 -
Figura 6 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão da ficocianina das amostras ambientais (Série 1: A,B, C, D, E, F, G e H). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).....	30 -
Figura 7 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina ( <i>mcyA</i> ) das amostras ambientais (Série 1: A,B,C,D,E,F,G, e H). Controlo positivo (C+) DNA da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> que apresenta banda nos 300 bp, e como controlo negativo (C-), água destilada. Os marcadores utilizados foram: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech). ....	31 -
Figura 8 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão da ficocianina das amostras de culturas de microalgas (Série 2: A,B e C). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).....	32 -
Figura 9- Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão da ficocianina das amostras de culturas de microalgas (Série 2: D). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech). ....	32 -
Figura 10 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão da ficocianina das amostras de culturas de microalgas (Série 2: E e F). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).....	32 -
Figura 11 - Imagem fotográfica dos géis de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina ( <i>mcyA</i> ) das amostras de culturas de microalgas (Série 2: A,B, C e D). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> (300 bp); Controlo negativo (C-), água de PCR. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech). ....	33 -
Figura 12 - Imagem fotográfica dos géis de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina ( <i>mcyA</i> ) das amostras de culturas de microalgas (Série 2: E e F). Controlo positivo (C+) DNA da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> (300 bp), Controlo negativo (C-), água destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech). ...	33 -
Figura 13 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão da ficocianina das amostras liofilizadas (Série 3: A,B, C, D, E e F). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech). ....	34 -
Figura 14 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina ( <i>mcyA</i> ) das amostras liofilizadas (Série 3: A e E). Controlo positivo (C+) DNA da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> (300 bp), Controlo negativo (C-), água destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).....	34 -



Figura 15 – Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão de ficocianina em cinco amostras obtidas por diluições sucessivas a partir de uma cultura pura de *Synechocystis* sp.PCC6803. Controlo positivo (C+) DNA da espécie *Synechocystis* sp.PCC6803 (700 bp), Controlo negativo (C-), água destilada. Marcador: M2 - Ladder VI (NZYTech). .....- 35 -

Na Tabela 13 indica-se o número de células a partir das quais foi realizada a extração de DNA de *Synechocystis* sp.PCC6803. Evidencia-se, igualmente, o número de células que correspondem ao DNA aplicado em gel de agarose. ....- 36 -

Figura 16 – Representação da reta de calibração obtida na análise de ELISA. Concentração no eixo horizontal: 0.15 a 5 ppb .....- 37 -

Figura 17 – Representação gráfica da análise de ELISA para as amostras ambientais (Série 1, Barras azuis) e para as amostras de culturas de microalgas em produção (Série 2, Barras verdes). A linha vermelha indica o limite legal (1 µg/L). ....- 37 -

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Principais cianotoxinas e géneros responsáveis pela sua produção em águas doces portuguesas (adaptado de Vasconcelos, V.M. <i>et al.</i> , 2006) .....	11 -
Tabela 2 – Métodos químicos e imunológicos utilizados na investigação de cianotoxinas (adaptado de Moreira <i>et al.</i> , 2014) .....	13 -
Tabela 3 – Códigos das amostras ambientais utilizadas neste trabalho, incluindo a descrição e local de recolha .....	17 -
Tabela 4 - Códigos das amostras de culturas de microalgas em produção incluindo a descrição .....	17 -
Tabela 5 - Códigos das amostras de microalgas liofilizadas e comercializadas, incluindo a descrição .....	17 -
Tabela 6 – Primers utilizados para deteção de cianobactérias e primers utilizados para deteção de cianobactérias produtoras de microcistinas .....	19 -
Tabela 7 – Programas utilizados na amplificação de modo a detetar cianobactérias e genes responsáveis pela produção de microcistinas .....	19 -
Tabela 8 - Observação microscópica dos controlos deste estudo, em campo claro e fluorescência .....	24 -
Tabela 9 – Observação microscópica das amostras ambientais em campo claro e fluorescência. (Códigos das amostras na Tabela 3) .....	25 -
Tabela 10 - Observação microscópica das amostras de culturas de produção de microalgas em campo claro e fluorescência. (Códigos das amostras na Tabela 4) .....	27 -
Tabela 11 - Observação microscópica das amostras liofilizadas de produto final em campo claro e fluorescência. (códigos das amostras na Tabela 5).....	29 -
Tabela 12 – Contagem celular das cinco suspensões preparadas a partir de um inóculo puro de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803. ND – Não determinado .....	35 -
Tabela 13 – Número de células usadas para extração de DNA e aplicadas em gel.....	36 -
Tabela 14 – Resultados obtidos nos diferentes métodos de análise deste estudo. O símbolo (+) é um resultado positivo. O símbolo (-) é um resultado negativo. ND – Não determinado.....	38 -

---

# Resumo

---

A produção de microalgas tem sido alvo de um grande interesse a nível científico e tecnológico devido às grandes potencialidades que apresenta. Esta tecnologia permite não só reduzir as emissões de dióxido de carbono de uma indústria emissora (e.g. elétrica, cimenteira) por utilização do efluente gasoso para produção de biomassa, como também utilizar a biomassa para a produção de suplementos para alimentação tanto humana como animal, para a produção de produtos de valor acrescentado utilizados nas indústrias farmacêutica e cosmética e para a produção de biocombustíveis. A produção de microalgas pode também ser utilizada para o tratamento de efluentes.

Existem diversos processos de produção de microalgas que operam sob condições diferentes, usando diferentes espécies destes organismos, desde sistemas abertos (*raceways*) a sistemas fechados (fotobiorreactores, PBR). Cada um destes sistemas apresenta vantagens e desvantagens. No caso dos *raceways*, são sistemas de cultivo menos dispendiosos. No entanto, a probabilidade de contaminação é mais elevada do que no caso dos sistemas fechados PBR (tecnologia mais cara) pelo que a produção industrial, neste tipo de reatores, é essencialmente de microalgas extremófilas (e.g. *Spirulina*, *Dunaliella*). Na produção de microalgas, o controlo de contaminações é uma tarefa essencial para garantir a viabilidade do inóculo e a qualidade do produto.

Como tal, com este trabalho pretende identificar-se um dos contaminantes críticos em cultivos de microalgas, as cianobactérias, pois estas podem, por um lado, facilmente dominar a cultura alterando as características do produto desejado e, por outro, algumas espécies apresentam a capacidade de produzir toxinas, nomeadamente microcistinas, que podem afetar gravemente a saúde dos organismos que ingerirem a biomassa contaminada ou produtos resultantes desta.

Neste trabalho, descrevemos a aplicação de diversos métodos segundo um conjunto de critérios necessários para o controlo de qualidade da produção de complementos alimentares, nomeadamente, métodos moleculares (PCR) e imunológicos de modo a detetar e identificar cianobactérias e suas toxinas na biomassa microalgal produzida à escala industrial.

Para a técnica de PCR, recorre-se a primers específicos, demonstrando a capacidade de detetar uma grande diversidade de cianobactérias com alta sensibilidade e ainda de verificar a presença de genes responsáveis pela síntese de microcistinas. Contudo, em amostras positivas para o operão da microcistina, poderá não haver produção da toxina se o operão estiver inativo. Para esses casos, demonstramos a utilização de testes imunológicos específicos (ELISA) para a quantificação de microcistinas na biomassa.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o controlo das cianobactérias e das toxinas, através deste conjunto multidisciplinar de técnicas, permite-nos obter resultados mais robustos e seguros acerca do produto em análise, reduzindo assim os riscos para a saúde pública. Além deste fator, esta simbiose de análises reduz ainda custos associados à produção

de microalgas pois diminui o risco de haver eliminação de culturas que possam estar à partida contaminadas, quando observadas apenas por microscopia em campo claro.

A implementação destes testes e a sua hierarquização permitiu desenvolver uma árvore de decisão que será utilizada, nas unidades de produção de microalgas, para o controlo de qualidade da biomassa produzida.

**Palavras-Chave: microalgas, cianobactérias, microcistina, PCR, ELISA**

---

# Abstract

---

The industrial production of microalgae has been a subject of great interest in the biotechnology field due to the high potential that it presents. This technology allows the reduction of carbon dioxide emissions of an industry (e.g: electric; cement manufacturer) by using the gaseous effluent to produce biomass and by also the use of this product to produce supplements for both human and animal food, to produce value added products used in the pharmaceutical and cosmetic industries and biofuel production. The production of microalgae can also be used for the treatment of effluents.

There are numerous microalgae production processes which operate under different conditions using different species, from open system (*raceways*) to closed systems (photobioreactors – PBR). Each of these systems have their advantages and disadvantages. The *raceways* are the less expensive cultivation systems, however, the contamination probability is higher than in the closed system PBR (more expensive technology), which is the reason why industrial production in this type of reactor is used for extremophiles microalgae (e.g: *Spirulina*; *Dunaliella*). In microalgae production, contamination control is an essential step to ensure the viability of the inoculum and the product quality.

This work intend to identify one of the critical contaminants in microalgae cultivation, cyanobacteria, as they can easily dominate the culture by changing the characteristics of the desired product and also possess the capacity to produce toxins such as microcystin, which can severely affect the health of the organisms that ingest contaminated biomass or derivatives.

In this work it is described the application of different methods according to a set of criteria necessary for the quality control of food supplements production, in particular, molecular (PCR) and immunological methods so as to detect and identify cyanobacteria and their toxins in microalgal biomass produced at industrial scale.

In PCR technique, specific primers are used, revealing the ability to detect a wide variety of cyanobacteria with high sensitivity and also to verify the presence of genes responsible for the microcystin syntheses. However, in samples positive for the microcystin operon, the toxin may not be produced if the operon is inactive. In such cases, it was applied specific ELISA's test for the quantification of microcystin in the biomass.

The results obtained in this work show that the control of cyanobacteria and toxins, through this multidisciplinary set of techniques, allows us to obtain more robust and reliable results on the product in question, thus reducing the risks to public health. In addition to this factor, the symbiosis of analysis also reduce the costs associated with microalgae production, when only microscopic observation is used for quality control, in case of suspicion of the cyanobacteria presence, the culture is eliminated. This decision, based only in one technique, incurs a high risk, since the operator may eliminate a culture which are contaminated, but that in fact represent no danger to public health and the product is found within the defined criteria.

The establishment of these tests and their ranking allows the development of a key decision that will be used for the quality control of the biomass produced.

**Keywords: microalgae, cyanobacteria, microcystin, PCR, ELISA**

---

# Motivação

---

A indústria de produção de microalgas tem evoluído significativamente nos últimos anos devido às grandes potencialidades que estes microrganismos apresentam. Um dos setores que tem demonstrado maior desenvolvimento na utilização das microalgas é o setor alimentar, como suplemento ou ingrediente alimentar, visto que a maior parte das microalgas são compostas por proteínas, hidratos de carbono, fibras, carotenóides, ácidos gordos, sais minerais, vitaminas, enzimas e esteróis.

Assim, tornou-se fundamental para esta indústria desenvolver ferramentas que permitam o controlo de qualidade destes novos produtos, nomeadamente a monitorização de contaminações.

O diagnóstico de cianobactérias é extremamente importante numa indústria de produção de microalgas pois fornece informação essencial para o futuro dos cultivos. No entanto, quando se recorre apenas à identificação das cianobactérias através da técnica de microscopia convencional, ocorre uma grande probabilidade de existirem erros na avaliação das amostras.

As cianobactérias são organismos que, podendo ser tóxicos, geralmente são difíceis de reconhecer apenas através de características morfológicas e citológicas pois não apresentam características específicas que nos permitam fazer uma identificação precisa da espécie. Além disso, não nos é possível identificar microscopicamente se estes microrganismos apresentam a capacidade de produzir compostos tóxicos.

A utilização de técnicas de biologia molecular para deteção e identificação de cianobactérias tem sofrido um enorme desenvolvimento ao longo destes últimos anos, nomeadamente na caracterização genómica. Este desenvolvimento permitiu a criação de ferramentas mais eficazes para a identificação e diferenciação destes microrganismos e ainda a deteção de marcadores genéticos de toxicidade. Esta identificação qualitativa de cianobactérias e toxinas levou também ao desenvolvimento de técnicas químicas e imunológicas para a quantificação destas cianotoxinas.

Neste âmbito surge este trabalho motivado para a identificação e deteção de cianobactérias e suas toxinas recorrendo a um conjunto multidisciplinar de técnicas para se construir um plano de ação fundamental de modo a cumprir todos os critérios de segurança e qualidade associados a produtos de microalgas para alimentação.





---

# 1. Introdução

---

## 1.1. Cianobactérias

As cianobactérias ou algas verdes-azuis são procariotas fotossintéticos oxigénicas que apresentam características similares aos primeiros organismos que habitaram na Terra. Estes procariotas já existem há pelo menos 2,7 bilhões de anos, como tal são considerados os primeiros produtores primários de matéria orgânica e os primeiros organismos produtores de oxigénio na atmosfera primitiva (Zanchett *et al.*, 2013).

Uma característica interessante nas cianobactérias é a sua distribuição geográfica que retrata a variação dos grupos ao nível do fenótipo e genótipo. Elas podem ser encontradas em meios dulçaquícolas ou em ambientes marinhos. No entanto, existem também muitas espécies que podem ser encontradas em habitat terrestres, apresentando um papel importante nos processos dos ecossistemas e no ciclo dos nutrientes. Outras espécies têm a capacidade de se desenvolverem em ambientes extremos, como por exemplo na Antártica e em fontes termais.

Determinadas espécies de cianobactérias, no seu habitat natural, são sujeitas a flutuações súbitas de fatores ambientais físicos e químicos, nomeadamente, luz, salinidade, temperatura e limitação de nutrientes. Este fato confere a estes organismos uma vantagem extremamente competitiva face a outros microrganismos (Zanchett *et al.*, 2013), como exemplo o género *Spirulina* que apresenta um maior crescimento quando se encontra entre 30° e 35°C (Oliveira *et al.*, 1999).

Existem mesmo espécies que conseguem sobreviver durante longos períodos de tempo em ambientes afóticos (ausentes de luz). Os recifes de corais, especialmente os mais degradados, são um exemplo do tipo de habitat onde cianobactérias são mais dominantes, pois apresentam capacidade de tolerar condições ambientais associadas aos impactos antropogénicos e às alterações climáticas (Zanchett *et al.*, 2013).

Todos estes fatores fazem com que as cianobactérias sejam microrganismos bem adaptados e com uma grande diversidade a nível morfológico, podendo ser unicelulares ou coloniais (filamentosas, esféricas ou amorfas) (Figura 1).

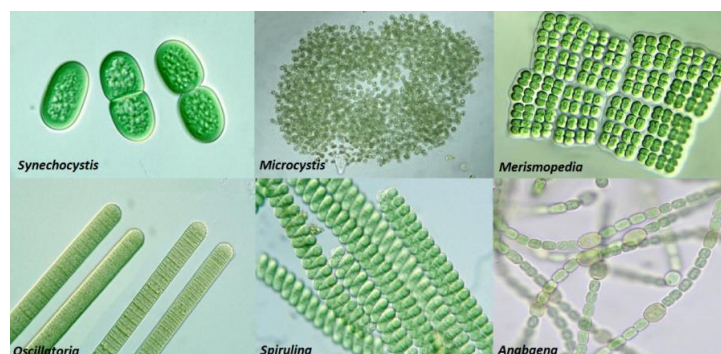


Figura 1 – Diferentes formas morfológicas do grupo das cianobactérias

Uma vez que as espécies de cianobactérias apresentam geralmente células maiores do que as células bacterianas e um comportamento mais semelhante às algas, foram classificadas como microalgas por um longo período de tempo e adquiriram o nome de algas verde-azuladas ou Cyanophyta.

Cianobactérias é um filo de bactérias que obtêm a sua energia através da fotossíntese. O nome "cianobactérias" é devido à sua coloração (ciano = azul), que deriva da presença de pigmentos específicos. A parede celular é do tipo gram-negativa e, em algumas espécies, a camada de peptidoglicano é consideravelmente mais espessa do que em outras bactérias. Muitas cianobactérias unicelulares e filamentosas possuem um "envelope" externo à camada constituída por lipopolissacáridos (LPS), "membrana externa", que é chamada bainha, glicocálice ou cápsula e depende da consistência do gel ou mucilagem. As bainhas de cianobactérias são predominantemente polissacáridos mas uma parte da sua massa pode ser polipéptidos e, dependendo da espécie, alguns tipos de resíduos de açúcar podem estar envolvidos no processo de formação das bainhas (Churro *et al.*, 2012).

As cianobactérias são autotróficas e contêm pigmentos acessórios pertencentes à família das ficobiliproteínas. Os pigmentos que fazem parte das ficobilinas primárias são a ficocianina (cianobactérias de água doce) e a ficoeritrina (cianobactérias de águas marinhas) que apresentam comprimentos de emissão de fluorescência de 620 e 580 nm, respetivamente (Lichtenthaler *et al.*, 2001; Gregor *et al.*, 2007; Kasinak *et al.*, 2015). Estes pigmentos acessórios encontram-se nos ficobilissomas localizados nas colunas sobre a superfície exterior dos tilacóides que, por sua vez, encontram-se livres no citoplasma (pensa-se que são invaginações da membrana celular) mas de forma organizada, na periferia da célula, é neles que encontramos os pigmentos fotossintéticos (Barsanti *et al.*, 2006).

As cianobactérias apresentam a capacidade de utilizar baixas intensidades de luz de uma forma eficaz, uma vez que são capazes de produzir os pigmentos acessórios de modo a absorver luz mais eficientemente no habitat em que se encontram presentes. A síntese de ficobiliproteína é particularmente suscetível a influências ambientais, especialmente a qualidade da luz. A adaptação cromática é, em grande parte, uma alteração na proporção entre a ficocianina e ficoeritrina nos ficobilissomas (Barsanti *et al.*, 2006).

Algumas espécies marinhas contêm vesículas de gás utilizadas para a regulação da flutuabilidade. Em algumas espécies de cianobactérias filamentosas formam-se heterocistos e acinetos. Os heterocistos são células vegetativas que foram alteradas drasticamente (perda do fotossistema II, desenvolvimento de uma espessa parede celular glicolipídica) de modo a fornecer o ambiente anoxigénico necessário para o processo de fixação de azoto (Figura 2). Todas estas adaptações e plasticidade proporcionam às cianobactérias uma grande vantagem para a colonização de uma vasta gama de nichos ecológicos (Barsanti *et al.*, 2006).



Figura 2 – Heterocisto (verde) de *Anabaena* sp.

(<http://www.corbisimages.com/stock-photo/rights-managed/42-23598666/anabaena-cyanobacteria-filaments-and-a-heterocyst-involved>, 7/3/15)

As cianobactérias conseguem multiplicar-se rapidamente em ambientes aquáticos formando blooms quando as condições são favoráveis ao seu desenvolvimento. Estes blooms podem ser perigosos tanto para os seres humanos como para os animais, especialmente os animais aquáticos, visto que determinadas espécies de cianobactérias produzem metabolitos secundários altamente tóxicos, conhecidos por cianotoxinas. Estudos recentes têm demonstrado que as alterações climáticas a nível global têm favorecido o aparecimento de cianobactérias tóxicas, aumentando assim a sua taxa de crescimento, persistência, atividades e distribuição geográfica (Zanchett *et al.*, 2013).

## 1.2. Cianotoxinas

Muitas atividades antropogénicas causam poluição, resultando na eutrofização dos ecossistemas aquáticos, comprometendo desta forma a qualidade da água para consumo humano. Esta eutrofização, resultante de descargas de elevadas concentrações de nutrientes nos ambientes aquáticos, origina os chamados blooms de cianobactérias e outros microrganismos, que muitas das vezes são constituídos por cianobactérias que apresentam a capacidade de produzir como metabolitos secundários, cianotoxinas (Bittencourt *et al.*, 2011).

Apesar da maioria da investigação, nesta área, ser feita no sentido da avaliação da toxicidade das cianobactérias, outros estudos têm sido realizados e têm mostrado outro lado das cianobactérias. Verificou-se que estes microrganismos têm, também, a capacidade de produzir compostos com propriedades biológicas com interesses nas áreas da farmacêutica e biotecnologia. Os efeitos farmacológicos importantes descritos incluem compostos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antibacterianos. As cianobactérias produzem uma matriz elaborada de metabolitos secundários que exibem uma ampla gama de bioatividades tornando-se numa fonte rica de compostos importantes para a conceção de novos medicamentos (Zanchett *et al.*, 2013).

Os efeitos destas cianotoxinas sobre o Homem e ecossistemas podem ser agudos, tais como redução do tempo de vida, diminuição das capacidades motoras podendo mesmo chegar a um estado de paralisia completa. Existem ainda casos de hemorragias e insuficiências renais que resultaram em morte. Os casos de efeitos crónicos são apresentados, por exemplo, pela redução da fertilidade e da taxa de crescimento da população, que pode surgir como resultado de concentrações sub-letais. De todas as cianotoxinas conhecidas, apenas as que apresentam

polipéptidos cíclicos (hepatotoxinas) exercem efeitos crónicos, tais como o desenvolvimento de tumores hepáticos, entre outros (Chorus *et al.*, 1999). No entanto, os efeitos dependem da espécie, do tipo de toxina produzida e da sua concentração (Zanchett *et al.*, 2013).

As cianotoxinas podem ser divididas em três grandes grupos de toxinas de acordo com a sua estrutura química: os **péptidos cíclicos**, nos quais estão incluídas as microcistinas e nodularinas hepatotóxicas; os **alcaloides** onde se inserem as cilindropermopsinas hepatotóxicas, as neurotoxinas e as citotoxinas, e por fim os **lipopolissacáridos**, que são as toxinas que causam forte irritação aquando em contacto com qualquer tecido exposto (Figura 3). Existem ainda duas outras toxinas marinhas pertencentes ao grupo dos alcaloides que causam irritações gastrointestinais e/ou cutâneas (Chorus *et al.*, 1999).

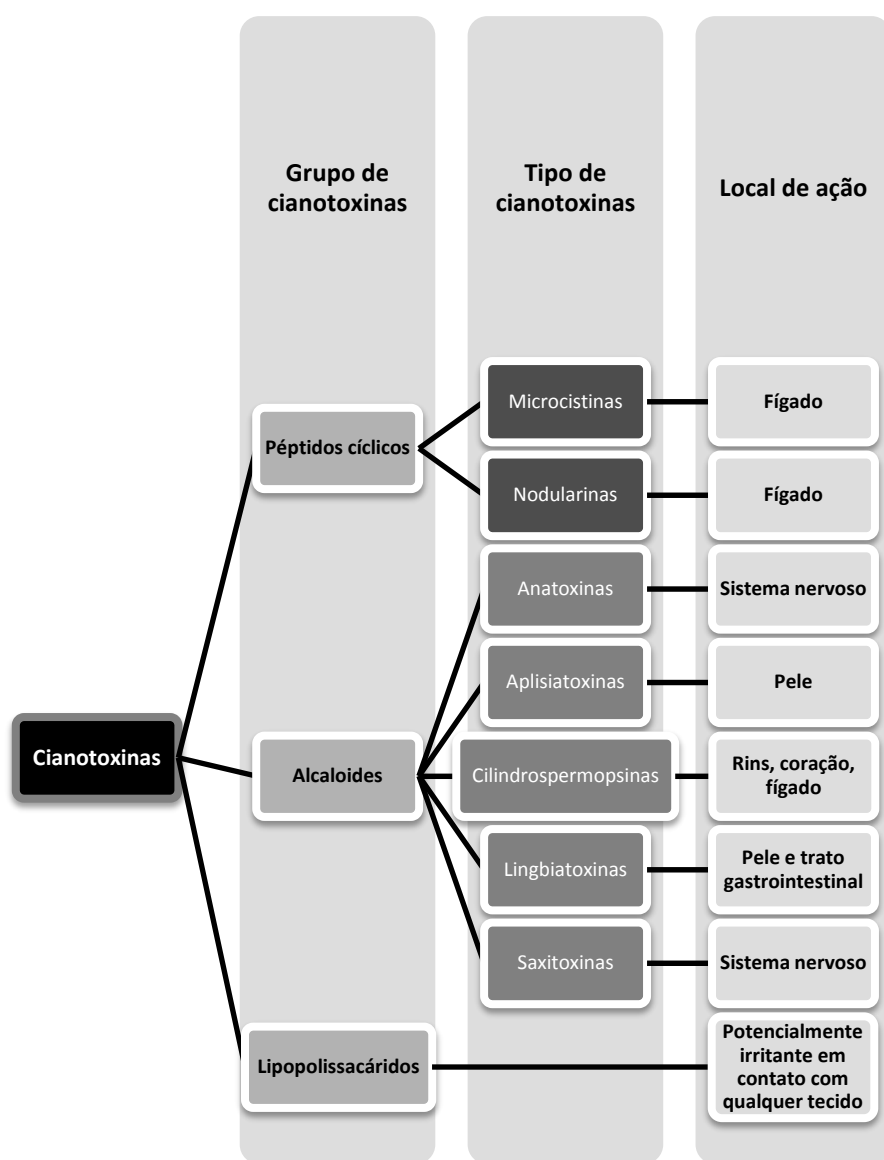


Figura 3 – Características principais das cianotoxinas

As hepatotoxinas podem ser divididas, a nível estrutural, em dois grupos: as microcistinas (que são as toxinas de interesse neste estudo) e as nodularinas. Para ambos os grupos, o órgão alvo nos animais é o fígado. As hepatotoxinas são na sua maioria hidrofílicas e, como não atravessam as membranas celulares, são transportadas para o fígado através dos transportadores iónicos

específicos que se encontram nos canais da vesícula biliar e no intestino delgado, onde exercem ação nos hepatócitos. Assim, as células hepáticas deixam de realizar as suas funções, provocando hemorragias e aumentando o volume do fígado devido à grande canalização de sangue para este órgão. Estas alterações provocam lesões irreversíveis e persistentes no sistema hepático, podendo provocar falências cardíacas, conduzindo muitas vezes à morte (Runnegar, 2001).

Nos seres humanos, a exposição às cianotoxinas pode ocorrer de várias formas, no entanto a via oral é a mais importante, principalmente através do consumo de água potável ou da ingestão de alimentos contaminados. A exposição dérmica e inalação são outras formas possíveis de contacto com estas toxinas. Os blooms tóxicos podem reaparecer periodicamente em ambientes hídricos e as pessoas podem ser cronicamente expostas a cianotoxinas em doses relativamente baixas (Zanchett *et al.*, 2013).

A inexistência de métodos de prevenção e de deteção de cianotoxinas resulta num contínuo consumo das águas contaminadas e, posteriormente, numa exposição prolongada dos consumidores tornando-se, assim, potenciais alvos de efeito crónicos (carcinomas hepáticos) (Chorus *et al.*, 1999).

Alguns casos reais foram apresentados nos quais se comprova o efeito das cianotoxinas na saúde humana. Em 1975 um surto de gastroenterite afetou cerca de 5000 pessoas, 60% da população abastecida pelo mesmo reservatório, Sewickley na Pensilvânia (E.U.A). Detetou-se uma espécie de cianobactéria, *Schizothrix calicola*, tanto nas fezes dos pacientes como no reservatório Sewickley, e testes posteriores comprovaram resultados positivos de toxicidade desta espécie (Hunter, P.R. 1998).

Em 1979, 140 crianças e 10 adultos tiveram de ser hospitalizados, em Palm Island, na Austrália, devido à ingestão de água contaminada com *Cylindrospermopsis raciborskii*, tendo resultado numa hepatoenterite juntamente com sintomas de mau estar, anorexia, vômitos e diarreias sanguinolentas severas (Hunter, P.R. 1998).

Outro caso de surto de gastroenterite, desta vez no Brasil (1988), afetou 2000 pessoas, das quais 80 morreram. Este surto teve uma duração de 42 dias e vários testes foram realizados, desde análises bacterianas, virais e metais pesados, mas todos apresentaram resultado negativo. Por fim realizaram análises à água, que era canalizada a partir de uma barragem, visto ser o ponto comum à maioria dos pacientes que sofreram com o surto. Os resultados foram positivos para cianobactérias tóxicas (*Anabaena* e *Microcystis*). Também no Brasil (1996), 117 pessoas que realizavam tratamento por hemodiálise, das quais 49 morreram, sofreram de uma intoxicação potenciada por cianotoxinas. O que se verificou foi que a unidade de saúde onde realizavam a hemodiálise se abastecia de água num reservatório contaminado por elevadas concentrações de cianobactérias, tais como *Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* (Hunter, P.R. 1998).

Após todos estes relatos de intoxicações por cianobactérias e cianotoxinas, a Organização Mundial de Saúde (WHO) decidiu emitir um valor guia para a concentração de MC-LR na água

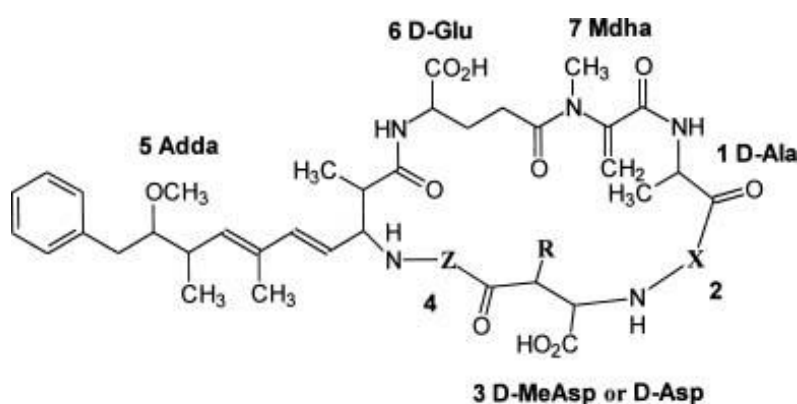
de consumo humano de 1 µg/L (World Health Organization, 2004). Este é principal fato que justifica o interesse de estudar esta cianotoxina neste trabalho.

### 1.2.1. Microcistinas

As microcistinas, tais como as nodularinas, fazem parte da família das hepatoxinas, um grupo de toxinas heptapeptídicas cíclicas. A estrutura geral da microcistina é ciclo-(D-alanine-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutamate-Mdha), na qual X e Z são aminoácidos L variáveis (Jungblut *et al.*, 2006).

As microcistinas fazem parte de uma família chamada hepatoxinas, as quais têm tido bastante atenção não só pelo fato de apresentarem capacidade de provocar envenenamentos agudos, como também devido ao seu potencial em promover cancro em indivíduos que consomem águas contaminadas com baixas concentrações de microcistinas, causando assim um grave risco de saúde pública (Figueiredo *et al.*, 2004).

As microcistinas são heptapéptidos cíclicos com uma estrutura cíclica geral ciclo(-d-Ala-l-X-erythro-b-methyl-d-isoAspL-Y-Adda-d-isoGlu-N-methyldehydro-Ala). O aminoácido Adda é considerado o responsável pelas moléculas hepatotóxicas. Existem ainda mais de 60 isoformas de microcistinas, em parte devido à variabilidade apresentada pelos L-aminoácidos X e Y, sendo a forma mais frequentemente estudada, a microcistina-LR (MC-LR) com os aminoácidos leucina (L) e arginina (R). Outras formas, que também ocorrem com maior frequência, são MC-RR, MC-YR e MC-LA (Figura 4) (Figueiredo *et al.*, 2004).



	microcystin	X	Z	R
1	MCYST-LR	Leu	Arg	CH <sub>3</sub>
2	MCYST-FR	Phe	Arg	CH <sub>3</sub>
3	MCYST-WR	Trp	Arg	CH <sub>3</sub>
4	[D-Asp <sup>3</sup> ] MCYST-FR	Phe	Arg	H
5	[D-Asp <sup>3</sup> ] MCYST-WR	Trp	Arg	H
6	MCYST-RA	Arg	Ala	CH <sub>3</sub>
7	MCYST-RR	Arg	Arg	CH <sub>3</sub>

Figura 4 – Estruturas das diferentes variantes de microcistinas (extraída de Lee *et al.*, 2000)

A microcistina MC-LR é conhecida por ser produzida por espécies pertencentes aos géneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*. A microcistina MC-YR é produzida por *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* e *Hapalosiphon* spp. A MC-RR tem sido isolada das

espécies *Oscillatoria agardhii*, *Microcystis aeruginosa* e *M. viridis* e a toxina MC-LA da espécie *Microcystis aeruginosa* (Figueiredo *et al.*, 2004).

As microcistinas são sintetizadas por um complexo não ribossomal dependente de energia. A síntese do complexo enzimático é codificada por um conjunto de genes, MCY, composto por dois operões (*mcyA-C* e *mcyD-J*) que se encontram presentes nas estirpes tóxicas do género *Microcystis* mas também nas estirpes produtoras de microcistinas, dos géneros *Anabaena*, *Nostoc* e *Planktothrix*. Estes operões permitem que sejam detetadas estas estirpes produtoras de microcistinas, de uma forma rápida e sensível, através da técnica de PCR, diretamente em amostras ambientais (Figueiredo *et al.*, 2004).

A produção de microcistinas ocorre nas águas doces do mundo inteiro e são, maioritariamente, produzidas por espécies coloniais, *Microcystis* spp., bem como por espécies filamentosas como por exemplo *Anabaena* spp., *Planktothrix/Oscillatoria* (*P. agardhii* and *P. rubescens*), *Anabaenopsis* spp., *N. rivulare*, *A. flos-aquae*. Existem ainda espécies terrestres do género *Hapalosiphon*. A MC-LR é conhecida por ser produzida por espécies que fazem parte do género *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*. No caso da MC-YR, esta toxina é, geralmente, produzida por *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* e *Hapalosiphon* spp. A MC-RR tem sido isolada das espécies *Oscillatoria agardhii*, *Microcystis aeruginosa* e *M. viridis*, e a MC-LA de *Microcystis aeruginosa* (Figueiredo *et al.*, 2004).

A hepatotoxicidade das microcistinas é observada pela inibição da proteína fosfatase 1 e 2A dos hepatócitos, levando à insuficiência renal aguda por via da perturbação dos componentes do citoesqueleto dos mesmos. Além disso, as microcistinas têm mostrado atividades na promoção de tumores e têm sido consideradas um elevado fator de risco que tem contribuído para a elevada taxa de carcinoma hepático no sudeste da China (Moreno *et al.*, 2004).

### 1.3. Ocorrência de cianobactérias em Portugal

Em Portugal, as blooms de cianobactérias têm sido reportadas por ocorrerem naturalmente em lagos, reservatórios de águas e grandes rios de fluxo lento desde o início dos anos 30 (Vasconcelos, V.M. 1999).

Nestes diversos recursos de água existentes no país, tem-se verificado o aumento da eutrofização e, muitos deles são utilizados para consumo humano, atividades recreativas (natação, canoagem, etc.) e agricultura. Isto levanta um problema muito sério a nível de saúde pública visto que este fenómeno promove o aparecimento dos blooms de cianobactérias e, consequentemente, o desenvolvimento das suas respetivas toxinas (Vasconcelos *et al.*, 1996).

Assim, cada vez mais tem havido necessidade de se monitorizar estes recursos hídricos e desenvolver métodos de deteção destas cianotoxinas. Em Portugal, esta monitorização é extremamente importante uma vez que existe escassez de água, especialmente nas estações mais quentes, e é necessário recorrer aos cursos de águas eutrofizadas como fonte de água potável (Vasconcelos *et al.*, 1996).

O problema dos blooms de cianobactérias e as suas respetivas toxinas, não é apenas um risco ao nível do consumo de água, mas também ao nível do consumo dos organismos aquáticos, tais como os organismos filtrantes (bivalves), moluscos e lagostins. Após vários estudos, verificou-se que as cianotoxinas, nomeadamente microcistinas e nodularinas, são bioacumuláveis podendo ser bioamplificáveis ao longo da cadeia alimentar (Vasconcelos, V.M. 1995).

O fato de as cianotoxinas serem bioacumuláveis e, por vezes, bioamplificáveis nos organismos aquáticos sem lhes provocarem efeitos letais, coloca-os como vetores de toxinas para os níveis tróficos superiores (incluindo o ser humano), tornando-se assim um perigo de saúde pública (Chorus *et al.*, 1999).

Em Portugal, as cianobactérias e cianotoxinas podem ser encontradas em diferentes sistemas aquáticos como em rios grandes de fluxo lento, tais como Guadiana, Tejo, Minho e Douro e nos lagos naturais, na região centro de Portugal entre Aveiro e a Figueira da Foz que mostram pesados blooms de cianobactérias tóxicas durante alguns meses do ano. Outros sistemas que têm apresentado blooms florações de cianobactérias tóxicas são os reservatórios de água potável como Torrão, Bravura e Aguieira (Saker *et al.*, 2005).

Além dos sistemas naturais, os blooms são um problema em sistemas artificiais entre os quais as estações de tratamento de águas residuais (ETAR), pois têm sido detetadas também populações de cianobactérias produtoras de toxinas. As toxinas encontradas nestes sistemas não são apenas responsáveis pelas alterações na dinâmica microbiana da ETAR, levando a uma menor eficiência na metabolização da matéria orgânica, mas também são responsáveis pela contaminação dos locais a jusante da ETAR (Vasconcelos, V.M. 2006).

A maioria das ocorrências tóxicas reportadas em Portugal são devido às microcistinas. A diversidade de microcistinas, bem como das outras cianotoxinas, foram listadas na Tabela 1.



Tabela 1 - Principais cianotoxinas e géneros responsáveis pela sua produção em águas doces portuguesas (adaptado de Vasconcelos, V.M. *et al.*, 2006)

Toxinas	Género de cianobactérias	Referência
<b>Microcistinas</b> MC-LA, MC-LR, MC-AR, MC-YR, MC-RR, [D-Asp <sup>3</sup> ] MC-LR [Dha <sup>7</sup> ]MC-LR, [L-MeSer <sup>7</sup> ]MC-LR MC-HiIR [D] MC-LR, MC-FR, MC(H4)-YR, MC-WR	<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Planktothrix</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 1995 Vasconcelos <i>et al.</i> , 1996 Saker <i>et al.</i> , 2005 Hisbergues <i>et al.</i> , 2003
<b>Anatoxina</b>	<i>Anabaena</i>	Saker <i>et al.</i> , 2005a
<b>Saxitoxinas</b> GTX5, GTX6, neoSTX, dcSTX, STX GTX1, GTX3, GTX4	<i>Aphanizomenon</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2000 Ferreira <i>et al.</i> , 2000
Cylin Cylin-A, Cylin-P	<i>Cylindrospermopsis</i>	Saker <i>et al.</i> , 2003a, 2003b

## 1.4. Identificação e detecção de cianobactérias e suas toxinas

### 1.4.1. Observação microscópica

Antes de se descobrirem os métodos moleculares para detetar e identificar cianobactérias, estes microrganismos eram classificados apenas pela observação morfológica por microscopia. Este método tradicional utiliza as características morfológicas e fenotípicas das cianobactérias, no entanto, comparando esta técnica às técnicas moleculares, a microscopia apresenta desvantagens, nomeadamente: requer prática e sensibilidade do operador que está a realizar a observação; é uma técnica morosa e algumas das características das cianobactérias (vacúolos de gás; acinetos) podem variar de acordo com as condições ambientais ou durante o seu ciclo de vida (Rudi *et al.*, 1997; Lyra *et al.*, 2001).

Existem géneros de cianobactérias que são fáceis de identificar por microscopia, devido às características morfológicas que apresentam serem significativamente diferentes. Noutros casos, estas diferenças não são tão claras, tais como diferenciar espécies dos géneros *Microcystis* de *Synechocystis*; *Anabaena* de *Nostoc*; *Anabaena* de *Aphanizomenon* e de *Nodularia* (Rudi *et al.*, 1997; Lyra *et al.*, 2001).

Para além destas dificuldades na identificação morfológica, a microscopia não consegue fornecer informação relativamente à toxicidade das cianobactérias. Existem cianobactérias em que na mesma espécie umas estirpes podem ser não produtoras e outras produtoras de toxinas. Entre as últimas diferentes estirpes podem desenvolver diferentes tipos de toxinas (Rudi *et al.*, 1997; Lyra *et al.*, 2001).

No entanto, a observação microscópica pode ajudar na distinção de microrganismos através dos seus pigmentos. A presença das ficobiliproteínas, nomeadamente, ficocianina e ficoeritrina (pigmentos existente nas cianobactérias), que permite captar a luz para que ocorra a fotossíntese, permite distinguir espécies semelhantes, como por exemplo, microrganismos filamentosos que não apresentam nenhuma das características típicas das cianobactérias (ex. heterocistos; acinetos; vacúolos de gás).

### 1.4.2. Métodos moleculares

As cianobactérias e as suas respetivas toxinas começaram a ser detetadas e identificadas, por métodos moleculares a partir de 1990, altura em que surgiram as primeiras publicações; hoje em dia são cada vez mais frequentes publicações sobre o tema.

Estes métodos moleculares baseiam-se na deteção das cianobactérias através de genes unicamente nelas presentes, bem como na deteção dos genes relacionados com a produção das cianotoxinas, sendo assim uma metodologia mais sensível, rápida e com maior especificidade do que as metodologias microscópicas.

Os vários métodos moleculares que têm sido, hoje em dia, desenvolvidos e aplicados na pesquisa de cianobactérias e cianotoxinas, baseiam-se em PCR, tais como multiplex PCR, T-RFLP, RAPD, DGGE e qPCR. Existem ainda métodos não baseados em PCR, nomeadamente, hibridação com fluorescência *in situ* (FISH) e microarranjos de DNA (Moreira *et al.*, 2014).

Além das vantagens já referidas anteriormente, estas metodologias permitem, também, avaliar a sua toxicidade, numa amostra ambiental, sem necessidade de isolar e fazer o crescimento das cianobactérias (Moreira *et al.*, 2014).

A PCR é, hoje em dia, uma técnica muito utilizada na indústria alimentar e clínica para identificação rápida de microrganismos, respondendo de forma quase instantânea aos pedidos dos clientes/utentes. Dispõe também de um limite de deteção consideravelmente mais baixo do que a tradicional microscopia, devido ao processo de amplificação exponencial do DNA do alvo. No entanto, esta tem como desvantagens o fato de ser uma tecnologia mais cara, que envolve mão-de-obra específica e técnica, e que requer primers específicos para cada contaminante a detetar.

### 1.4.3. Deteção imunológica

Apesar dos métodos moleculares permitirem detetar e identificar as cianobactérias, e ainda avaliar o seu potencial em produzir cianotoxinas, necessitamos de outros métodos para identificar e quantificar quais as toxinas presentes nas amostras. Os diferentes métodos específicos mais utilizados na avaliação das cianotoxinas estão referenciados na Tabela 2 (adaptada de Moreira, 2014).

Tabela 2 – Métodos químicos e imunológicos utilizados na investigação de cianotoxinas (adaptado de Moreira *et al.*, 2014)

Método	Técnica	Cianotoxinas
<b>Métodos Físico-químicos</b>	HPLC-UV	Microcistinas
	HPLC-PDA	Cilindrospermopsinas
	HPLC-FLD	Anatoxinas Saxitoxinas
	GC-MS	Anatoxinas
	MALDITOF-MS	Microcistinas Anatoxinas Nodularinas
<b>Método Imunológico</b>	ELISA	Microcistinas Nodularinas Saxitoxinas Cilindrospermopsinas

Neste trabalho aplicaremos um método imunológico, que utiliza anticorpos mono ou policlonais, designado por ELISA (Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Este método é rápido e simples, quando comparado a outros métodos analíticos com o mesmo

objetivo, tais como HPLC e MALDITOF-MS. Além disto, o método de ELISA necessita de pouca quantidade de amostra, sendo capaz de detetar quantidades dentro dos limites impostos pela legislação. Esta técnica é prejudicada pelo fato das microcistinas apresentarem uma elevada variação estrutural, podendo existir a possibilidade de ocorrer reações cruzadas entre os anticorpos com diferentes variantes da toxina ou com outros compostos que possam estar presentes nas amostras, podendo estas reações não exprimirem corretamente os valores de concentração da toxina (Rapala *et al.*,2002).

Esta metodologia foi desenvolvida em 1989, por Chu *et al.*, e desde então a técnica foi desenvolvida de tal forma que hoje em dia são comercializados kits (Microcystins, Adda specific ELISA kit, Enzo) frequentemente utilizados em laboratórios de monitorização de cianotoxinas nas águas e solos. Estes kits são constituídos por padrões de microcistinas de concentrações conhecidas, e visto que o reconhecimento anticorpo/antigénio emite uma cor, é possível traçar uma recta padrão, por espectrofotometria, de modo a determinar a concentração da toxina existente nas amostras em teste.

## 1.5. Objetivos

Este trabalho tem como principais objetivos:

1. Desenvolver uma árvore de decisão para a monitorização de culturas de microalgas numa produção industrial.
2. Aplicar e desenvolver métodos de deteção e identificação de cianobactérias recorrendo a diversas técnicas: microscopia ótica e de fluorescência; PCR e ELISA.
3. Avaliar a diversidade, a nível de cianobactérias e outros microrganismos presentes nos ecossistemas do local onde se encontram inseridas as unidades de produção de microalgas.

---

## 2. Materiais e Métodos

---

### 2.1. Amostras de cianobactérias

As amostras utilizadas neste trabalho incluíram: amostras ambientais, recolhidas em diferentes pontos geográficos; amostras de culturas frescas de microalgas em produção; amostras de microalgas processadas (liofilizada) e comercializadas.

As amostras ambientais (Tabela 3) têm como objetivo avaliar a diversidade dos ecossistemas do local onde se encontram inseridas as unidades de produção da A4F, AlgaFuel S.A. Assim, podemos identificar quais as espécies de microalgas e outros microrganismos contaminantes que poderão aparecer nos cultivos de microalgas nas unidades de produção.

No caso das amostras de culturas frescas de microalgas (Tabela 4), foram analisadas neste estudo para testar a presença de cianobactérias. Estas culturas de microalgas são produzidas para suplementos alimentares e, como tal, é necessário assegurar todos os parâmetros de qualidade e segurança do produto.

As amostras ambientais foram recolhidas em Lisboa, em poças de águas paradas, lagos e fontes decorativas; recolhidas no ambiente em redor de uma unidade de produção de microalgas existente na região de Leiria; e são provenientes de fotobioreactores fechados, nos quais existem suspeitas da presença de cianobactérias.

As amostras ambientais foram recolhidas dia 6 de maio de 2014, observadas ao microscópio com fluorescência e mantidas em dois tipos de meio: Z-8 (Kotai, J., 1972 ) e meio MMF (meio standard da A4F). Estas culturas foram mantidas em frascos de plástico de 50 mL, numa sala de cultivo à temperatura 25°C, com luz artificial (Philips, 36W/865) e com iluminação continua.

Tanto as amostras ambientais como as de culturas em produção, em sistema fechado, foram recolhidas para tubos Falcon 50 mL ou para frascos Schott 500 mL, estéreis.

As amostras de culturas em produção e liofilizadas (Tabela 5) foram imediatamente utilizadas ao serem recebidas.

Todas as amostras utilizadas neste trabalho, com exceção dos controlos, não foram isoladas visto que o objetivo é utilizar uma amostra em bruto de modo a obter resposta rápida quanto à presença de cianobactérias e/ou suas respetivas toxinas.

Tabela 3 – Códigos das amostras ambientais utilizadas neste trabalho, incluindo a descrição e local de recolha

Série	Código da amostra	Descrição da amostra	Local
1	A	Fonte ornamental	Lisboa
	B	Poça de água concentrada	Lisboa
	C	Poça de água diluída	Lisboa
	D	Fonte ornamental	Lisboa
	E	Sistema de captura de água doce	Lisboa
	F	Sistema de captura de água doce	Leiria
	G	Sistema de captura de água salgada	Lisboa
	H	Fotobioreactor	Leiria

Tabela 4 - Códigos das amostras de culturas de microalgas em produção incluindo a descrição

Série	Código da amostra	Descrição da amostra
2	A	Cultura de microalgas de água doce
	B	Cultura de microalgas de água salgada
	C	Cultura de microalgas de água salgada
	D	Cultura de microalgas de água salgada
	E	Cultura de microalgas de água salgada
	F	Cultura de microalgas de água salgada

Tabela 5 - Códigos das amostras de microalgas liofilizadas e comercializadas, incluindo a descrição

Série	Código da amostra	Descrição da amostra
3	A	Microalga comercializada em pó – Marca 1
	B	Microalga comercializada em pó – Marca 2
	C	Microalga comercializada em pó – Marca 3
	D	Microalga comercializada em pó – Marca 4
	E	Microalga comercializada em pó – Marca 5
	F	Microalga comercializada em pó – Marca 6

## 2.2. Identificação morfológica

As amostras analisadas neste estudo foram observadas num microscópio ótico Olympus BX53 com unidade de fluorescência Olympus U-RFL-T, do qual se utilizou o cubo Olympus U-FGNA. Este cubo tem um filtro de excitação de comprimento de onda 540-550 nm (verde), espelho dicróico de comprimento de onda 570 nm e filtro de barreira com comprimento de onda de 575-625 nm. O registo fotográfico foi feito com a máquina digital Olympus Pen Life.

Os parâmetros analisados na observação microscópica, em campo claro, das cianobactérias foram tipo de forma das células filamentosas ou cocóides; presença ou ausência de ficobilissomas; presença ou ausência de células vegetativas (tricomas, acinetos); presença ou ausência de bainha mucilaginosa; a morfologia dos filamentos - helicoidais ou em linha recta; se têm forma de barril no interior ou forma de disco; presença ou ausência de ramificação lateral; presença ou ausência de células especializadas.

Além disto, na observação microscópica das amostras testadas, verificou-se também a presença ou ausência de microalgas e contaminantes, desde bactérias, fungos, protozoários, larvas de insetos, cistos ou ovos.

A observação microscópica com fluorescência foi utilizada para verificar a presença de cianobactérias através da fluorescência da ficoeritrina.

## 2.3. Métodos moleculares

### 2.3.1. Extração de DNA

Todas as amostras, referenciadas e analisadas neste trabalho, foram previamente processadas antes de se realizar a extração de DNA. No entanto, o processamento prévio diferiu entre as amostras aquosas (amostras ambientais e de produção) e as liofilizadas (produto final):

- a) **Amostras aquosas:** Filtrou-se 50 mL de cada uma das amostras através da técnica de vácuo, utilizando rampas de filtração estéreis (Millipore) e recorrendo a uma bomba de vácuo (Cometa). Os filtros utilizados (Whatman, GE Healthcare Life Sciences) apresentavam-se individualmente esterilizados, com uma porosidade 0,2 µm. Os filtros foram recolhidos para Falcon estéreis de 15 mL, reduzidos em pequenas porções, ressuspendidos em 3 mL de água e homogeneizados utilizando o vórtex (Mixer VELP SCIENTIFICA). Retiraram-se 500 µL desta suspensão para proceder à extração de DNA.
- b) **Amostras liofilizadas:** Para cada uma das amostras, pesou-se 10 mg de pó, ressuspendeu-se e homogeneizou-se num tubo eppendorf com 1 mL de água (concentração final 10 g/L). De seguida procedeu-se à centrifugação das amostras (centrífuga Mini Spin Eppendorf Plus) e eliminou-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 500 µL de água e utilizado para a extração de DNA.

O DNA genómico das amostras foi extraído recorrendo ao kit de extração de DNA: “FastDNA SPIN Kit for soil” (MPbio), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante.



### 2.3.2. Amplificação por PCR

Neste trabalho utilizaram-se dois tipos diferentes de primers (Tabela 6). O par PC $\beta$ F/PC $\alpha$ R tem como objetivo detectar a presença de cianobactérias através do gene responsável pela produção de ficocianina e o par mcyA\_CdF/mcyA\_CdR para detectar a presença do gene responsável pela produção de microcistinas.

Tabela 6 – Primers utilizados para detecção de cianobactérias e primers utilizados para detecção de cianobactérias produtoras de microcistinas

Primers	Sequência (5' a 3')	Tamanho (bp)	Função do gene interesse	Referência
<b>PC<math>\beta</math>F</b>	GGCTGCTTGTTTACGCGACA	650-700	Síntese ficocianina	Fonseca <i>et al.</i> , 2011
<b>PC<math>\alpha</math>R</b>	CCAGTACCACCAGCAACTAA			Saker <i>et al.</i> , 2005a Neilan <i>et al.</i> , 1995
<b>mcyA_CdF</b>	AAAATTAAAAGCCGTATCAAA	297-300	Síntese microcistinas	Fonseca <i>et al.</i> , 2011
<b>mcyA_CdR</b>	AAAAGTGTTTATTAGCGGCTCAT			Frazão <i>et al.</i> , 2010 Hisbergues <i>et al.</i> , 2003

Todas as reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25  $\mu$ L, dos quais fizeram parte 1  $\mu$ L de cada par de primer, 10,5  $\mu$ L de água de PCR, 12,5  $\mu$ L de Supreme NZYTaq 2x Green Master Mix e 1  $\mu$ L de DNA. Os programas utilizados (Termociclador Thermo Scientific Arktik) apresentam-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Programas utilizados na amplificação de modo a detectar cianobactérias e genes responsáveis pela produção de microcistinas

Primers	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 5	Fase 6
<b>PC<math>\beta</math>F / PC<math>\alpha</math>R</b>		35 Ciclos				
	95°C	95°C	50°C	72°C	72°C	4°C
	10 min	110 s	30 s	30 s	7 min	$\infty$
<b>mcyA_CdF/ mcyA_CdR</b>		Fase 2	Fase 3	Fase 4		
	Fase 1	35 Ciclos			Fase 5	Fase 6
	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
	5 min	30 s	30 s	1 min	7 min	$\infty$

Os produtos de PCR foram separados por electroforese (Mupid-One Advance) em gel de agarose a 2%. A voltagem aplicada foi de 100 V durante 40 minutos e em cada poço foi aplicado 5 µL de produto de PCR de amostra testada.

Como controlos positivos utilizaram-se duas espécies de cianobactérias isoladas: o controlo utilizado para o PCR de identificação do operão da ficocianina foi uma estirpe da estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803; para a identificação do gene produtor de microcistinas foi a espécie *Microcystis aeruginosa*, cedida pelo Instituto Ricardo Jorge (INSA). No controlo negativo para o PCR da identificação da ficocianina a amostra foi substituída por água e no caso do PCR para deteção do gene produtor de microcistina ou foi substituída por água ou por uma estirpe de *Synechocystis* sp., que não apresenta essa capacidade genética.

## **2.4.Determinação do limite de detecção da observação microscópica e da amplificação por PCR**

As amostras em estudo neste trabalho foram analisadas por observação microscópica e por um método molecular PCR. De forma a verificar a sensibilidade de cada uma das técnicas mencionadas realizou-se um experiência para determinação do limite de detecção. Deste modo, a partir de um inóculo de *Synechocystis*, realizaram-se cinco diluições decimais sucessivas, e procedeu-se à contagem celular de cada uma recorrendo a uma câmara de Neubauer (Marienfeld). O processo de extração de DNA das suspensões obtidas por diluição foi idêntico ao aplicado nas amostras aquosas analisadas neste trabalho (2.3.1a) e utilizou o par de primers PCaR/PCβF para amplificar o fragmento (700 bp) correspondente ao operão da ficocianina.

## **2.5.Análise ELISA**

A detecção de toxinas pelo método de ELISA foi executada recorrendo ao kit Microcystins (Adda specific) ELISA kit ALX-850-319 e teve como principal objetivo fazer o reconhecimento das toxinas, microcistinas e nodularinas, bem como a sua quantificação através de espectrofotometria.

A técnica de ELISA baseia-se na interação anticorpo-antigénio, ou seja neste caso específico, na presença de uma das toxinas referidas (microcistinas ou nodularinas) ocorre reconhecimento por parte do anticorpo específico.

Uma microplaca de teste tem 96 poços e em cada um dos poços existe o mesmo número de locais de ligação aos anticorpos. Quando adicionada a solução conjugada de microcistina-enzima, estas moléculas conjugadas ligam-se aos anticorpos presentes na microplaca, conferindo uma coloração azul forte ao poço. A coloração azul é tanto mais forte quanto mais baixa for a concentração de microcistina uma vez que, quanto maior for a concentração de microcistinas na amostra, menor o sinal que se obtém a nível da coloração (tonalidade azul claro) pois os anticorpos deixam de se ligar às moléculas conjugadas para se ligarem às microcistinas.

Neste trabalho utilizaram-se apenas as amostras aquosas, isto é, as amostras ambientais e as amostras de culturas de microalgas da unidade de produção. As amostras liofilizadas não foram analisadas devido ao fato do procedimento do kit ELISA utilizado não ter sido concebido para amostras em estado sólido.

Antes de analisar todas as amostras discriminadas anteriormente, realizou-se um pré-ensaio em que se utilizaram os seis padrões *standards* de diferentes concentrações de microcistina (0,0; 0,15; 0,40; 1,0; 2,0 e 5,0 ppb), o controlo e uma amostra ambiental, de modo a testar o método. Com base no resultado deste pré-teste, procedeu-se à análise das amostras referidas anteriormente conforme o protocolo do fabricante do kit.

Os resultados obtidos foram analisados por espectrofotometria a 450 nm, com o auxílio de um espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS ThermoScientific.

### 3. Resultados

Com base na pesquisa bibliográfica realizada elaborou-se uma árvore de decisão para a monitorização das culturas de microalgas numa unidade industrial, apresentada na Figura 5.

Nesta árvore de decisão compilaram-se e organizaram-se todas as metodologias, referenciadas e, posteriormente, testadas neste trabalho, de maneira a existir uma sequência lógica para a realização dos trabalhos de monitorização das culturas de microalgas. A montagem da árvore foi feita de modo a que, no fim de cada técnica, seja possível tomar uma decisão em relação ao rumo da cultura em análise.

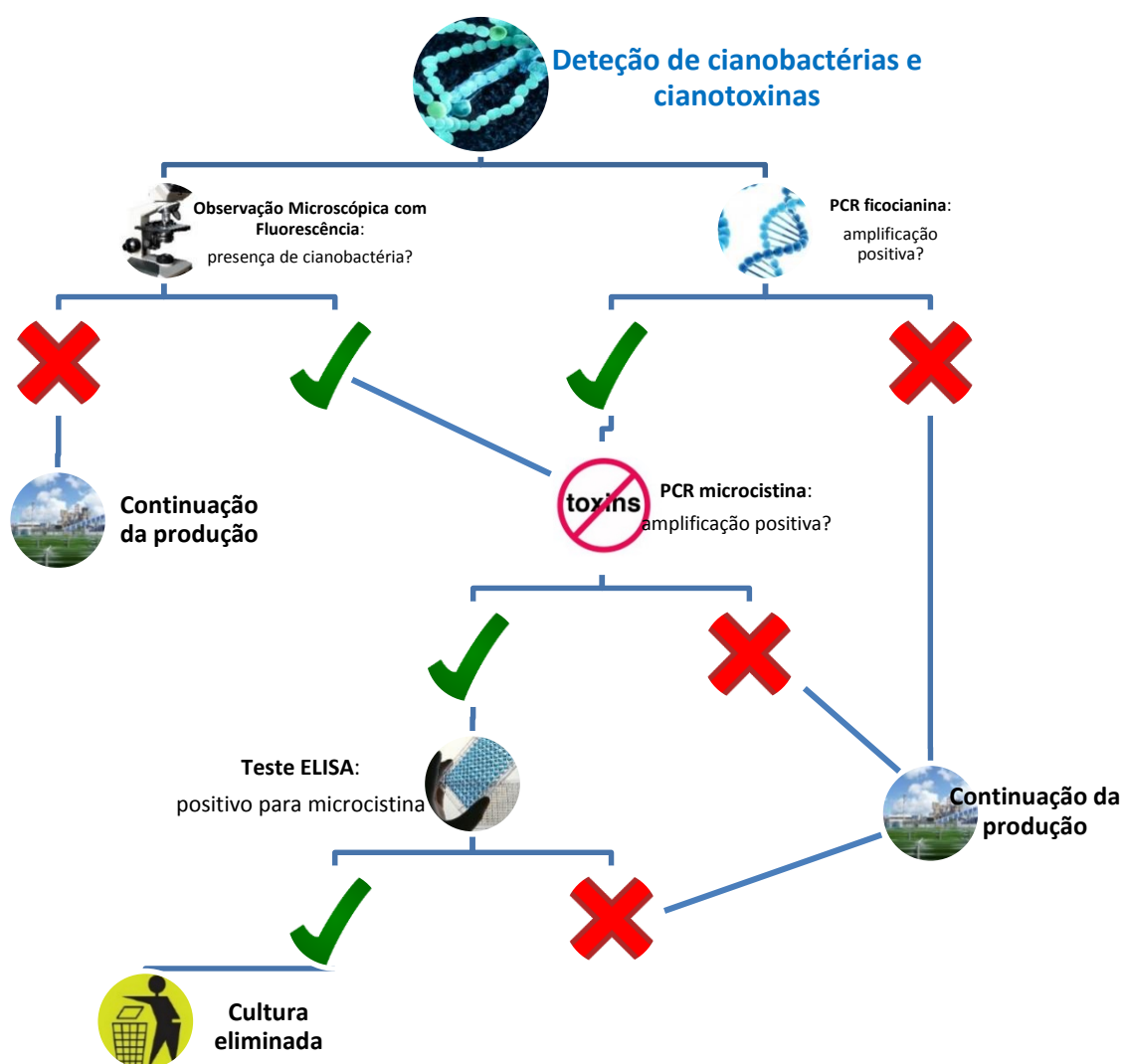


Figura 5 – Diagrama da árvore de decisão para a monitorização de culturas de microalgas produzidas à escala industrial

### 3.1. Identificação morfológica

A observação microscópica, em campo claro, foi utilizada para detetar estruturas morfológicas típicas de cianobactérias (pigmento das células; presença ou ausência de células especializadas; forma dos filamentos; etc.), o que por vezes não é fácil pois estas características nem sempre se encontram presentes em todas as cianobactérias, surgindo dúvidas de identificação de alguns microrganismos.

Deste modo recorreu-se a métodos de fluorescência utilizando-se um filtro específico para deteção da ficocianina. Esta especificação permitiu concluir, de forma mais eficiente e rápida, sobre a presença ou ausência de cianobactérias nas amostras analisadas através da fluorescência do pigmento característico das cianobactérias, a ficocianina.

Como forma de validar esta nova metodologia em implementação, utilizaram-se três espécies de microrganismos como controlos. Na Tabela 8 pode verificar-se o resultado obtido na observação microscópica em campo claro e em fluorescência das espécies controlo.

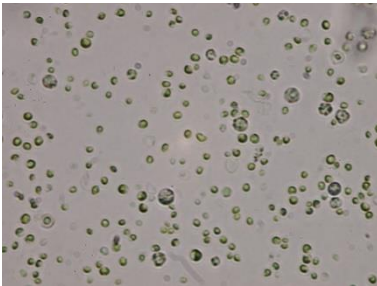
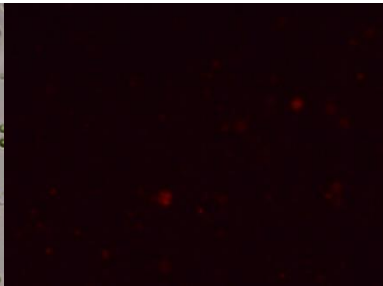
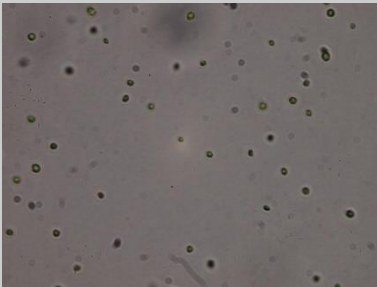

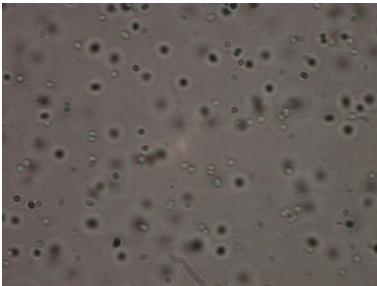
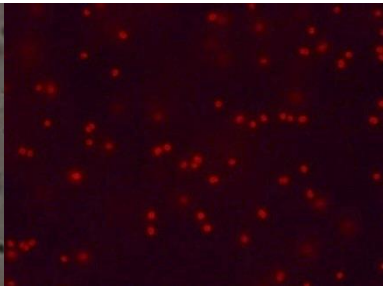
Na observação de *Chlorella*, com fluorescência, verificou-se a presença de fluorescência nas células de maiores dimensões, provavelmente, devido ao fato da clorofila (pigmento predominante) apresentar alguma autofluorescência residual nos comprimentos de onda selecionados pelo filtro.

No caso de *Nannochloropsis* (microalga de água salgada), a clorofila também é o pigmento predominante, no entanto a quantidade presente em cada célula é inferior à de *Chlorella*. Além disso, *Nannochloropsis* tem, em média, 2 a 5 µm de diâmetro enquanto *Chlorella* apresenta 3 a 10 µm de diâmetro médio. Estes fatores fazem com que a autofluorescência residual, da clorofila da microalga de água salgada, não seja suficiente para ser detetada.

Contudo, em ambas as espécies, a fluorescência da ficocianina não foi observada, sendo assim utilizadas como controlos negativos.

Relativamente à cianobactéria *Synechocystis*, apresentou uma fluorescência intensa, característica da presença da ficocianina, tal como era esperado para o controlo positivo.

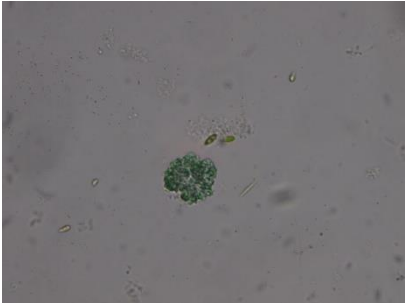
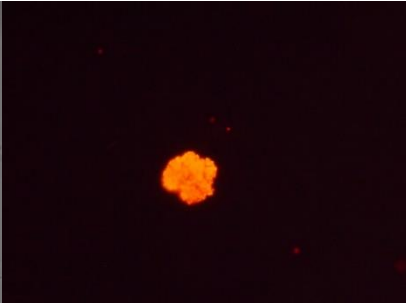

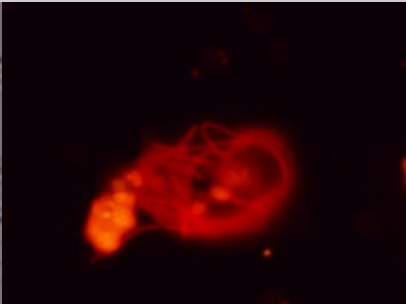




Tabela 8 - Observação microscópica dos controles deste estudo, em campo claro e fluorescência


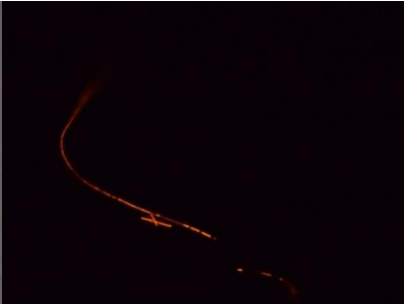
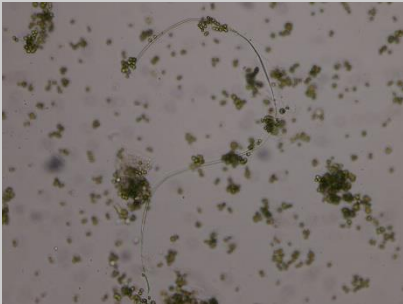

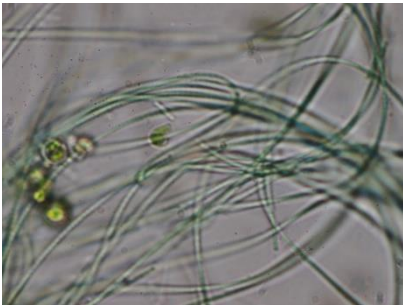

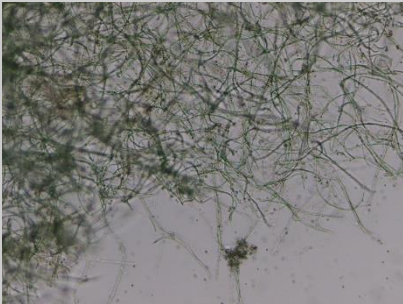
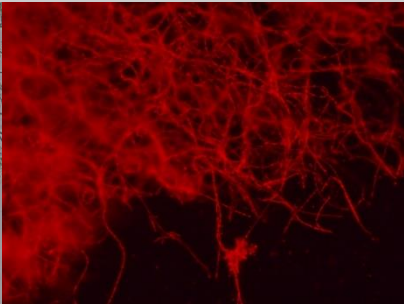
Amostra	Foto		Ampliação (objetiva x ocular)
	Campo Claro	Fluorescência	
<b>Controlo (-)</b> <i>Chlorella</i> sp.			40x10
<b>Controlo (-)</b> <i>Nannochloropsis</i> sp.			40x10
<b>Controlo (+)</b> <i>Synechocystis</i> sp.			60x10

### 3.1.1. Amostras ambientais

A Tabela 9 mostra as observações microscópicas em campo claro e com fluorescência realizadas às amostras recolhidas nos locais de proximidade das unidades de produção de microalgas. Em grande parte das amostras foi possível observar-se o pigmento verde-azulado característico da ficocianina. O resultado da observação microscópica com fluorescência revelou em todas as amostras, exceto a amostra F, fluorescência forte resultante da presença de ficocianina (laranja-avermelhada intenso). As microalgas observadas em campo claro não apresentam fluorescência como se pode verificar nas amostras assinaladas com círculos amarelos (série 1 amostras C e D) da Tabela 9. Estes resultados mostram que, nos ambientes analisados, verificou-se geralmente a presença de cianobactérias.

Tabela 9 – Observação microscópica das amostras ambientais em campo claro e fluorescência. (Códigos das amostras na Tabela 3)

Amostra	Foto		Ampliação (objetiva x ocular)
	Campo Claro	Fluorescência	
1.A (Fonte ornamental)			40x10
1.B (Poça de água concentrada)			80x10
1.C (Poça de água diluída)			80x10
1.D (Fonte ornamental)			40x10

Amostra	Foto		Ampliação (objetiva x ocular)
	Campo Claro	Fluorescência	
1.E (Captura de água doce)			40x10
1.F (Captura de água doce)			20x10
1.G (Captura de água salgada)			80x10
1.H (PBR)			20x10

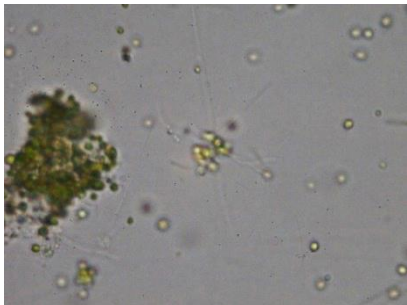
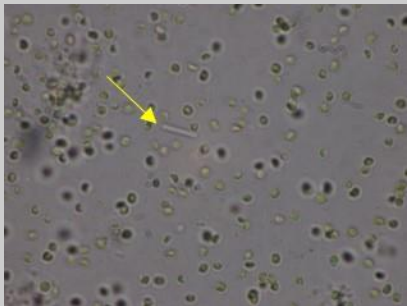
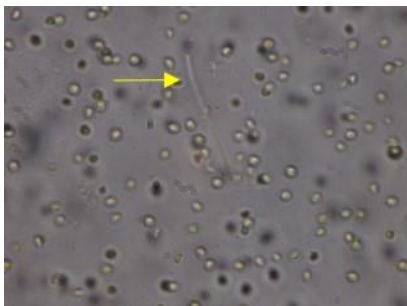


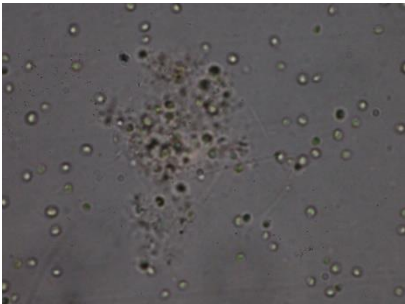
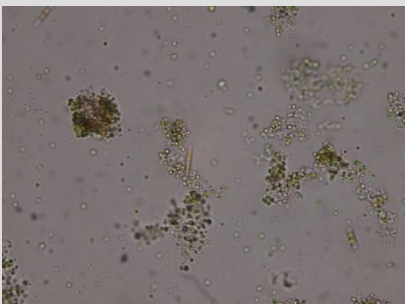
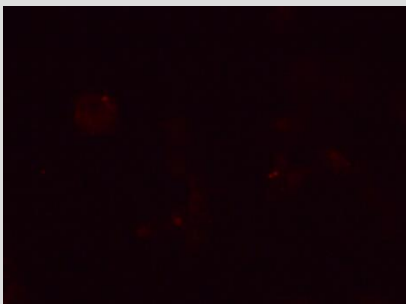


### 3.1.2. Amostras de culturas de microalgas em produção

Na Tabela 10 apresentaram-se os resultados da observação das amostras de culturas de microalgas em produção utilizadas neste estudo. Em campo claro observaram-se algumas estruturas pequenas e filamentosas (setas amarelas) que poderiam ser identificadas como cianobactérias. No entanto, a ausência de fluorescência indica-nos que não são cianobactérias mas, possivelmente, bactérias filamentosas.

Nas amostras 2.E e 2.F, verificaram-se baixos níveis de fluorescência deixando algumas dúvidas em relação à presença de cianobactérias. Estes baixos níveis poderão ser devido a interferência da clorofila, tal como aconteceu no controlo positivo (*Chlorella*), na Tabela 8.

Tabela 10 - Observação microscópica das amostras de culturas de produção de microalgas em campo claro e fluorescência. (Códigos das amostras na Tabela 4)

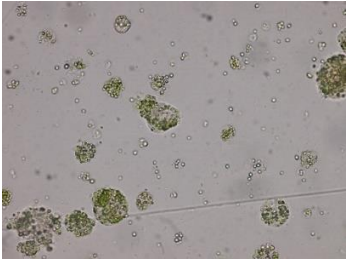
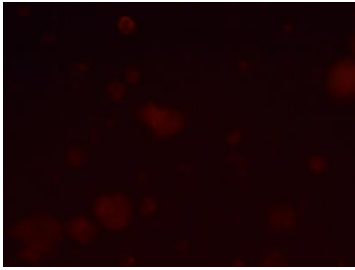
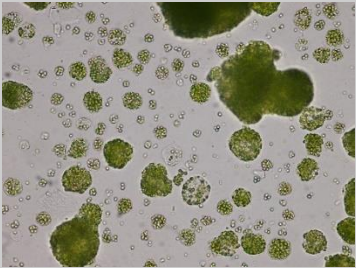
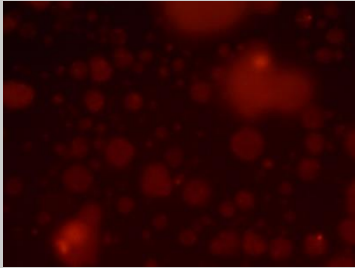
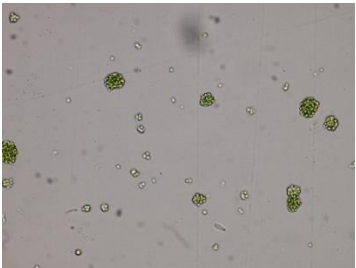
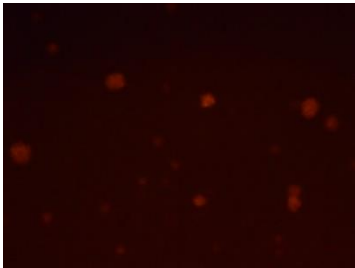
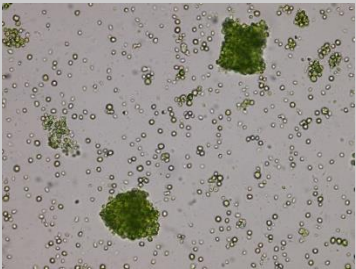
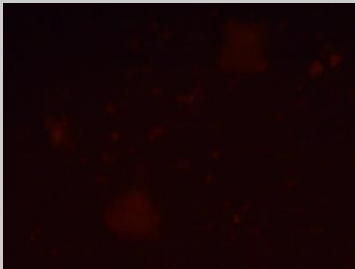
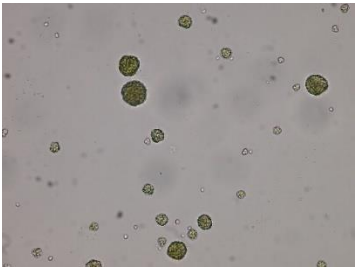
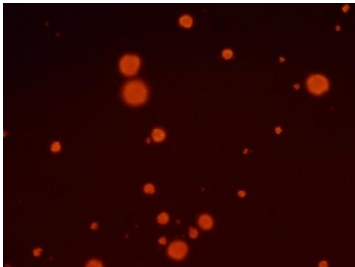
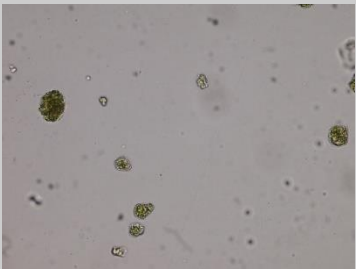
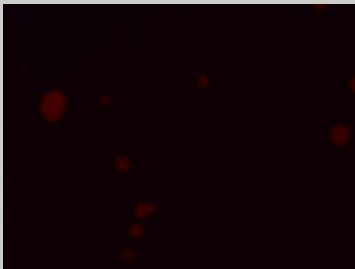
Amostra	Foto		Ampliação (objetiva x ocular)
	Campo Claro	Fluorescência	
<b>2.A</b> (cultura de água doce)		Não apresentou nenhuma fluorescência	80x10
<b>2.B</b> (cultura de água salgada)		Não apresentou nenhuma fluorescência	80x10
<b>2.C</b> (cultura de água salgada)		Não apresentou nenhuma fluorescência	80x10

Amostra	Foto		Ampliação (objetiva x ocular)
	Campo Claro	Fluorescência	
<b>2.D</b> (cultura de água salgada)		Não apresentou nenhuma fluorescência	80x10
<b>2.E</b> (cultura de água salgada)			40x10
<b>2.F</b> (cultura de água salgada)			20x10

### 3.1.3. Amostras liofilizadas (produto final)

As amostras liofilizadas mostraram, em campo claro, grandes aglomerados de microalgas (característica de biomassa seca e posteriormente ressuspensa) e ao utilizar o cubo de fluorescência, estes fluoresceram como se pode verificar nas imagens da Tabela 11. No entanto, muitos destes aglomerados com fluorescência (laranja tênue) deverão corresponder à autofluorescência da clorofila, tal como aconteceu com o controlo negativo de *Chlorella*, apresentado anteriormente. As amostras que mostraram uma maior intensidade de fluorescência e semelhança com o controlo positivo (*Synechocystis*) foram as amostras B e E.

Tabela 11 - Observação microscópica das amostras liofilizadas de produto final em campo claro e fluorescência. (códigos das amostras na Tabela 5)

Amostra	Foto		Ampliação (objetiva x ocular)
	Campo Claro	Fluorescência	
<b>3.A</b> (Marca 1)			20x10
<b>3.B</b> (Marca 2)			20x10
<b>3.C</b> (Marca 3)			20x10
<b>3.D</b> (Marca 4)			20x10
<b>3.E</b> (Marca 5)			20x10
<b>3.F</b> (Marca 6)			20x10

## 3.2.Deteção por PCR

A observação microscópica das amostras em campo claro permitiu diferenciar fenotipicamente os microrganismos presentes nas culturas em análise. Ao adicionar-se a fluorescência, foi possível distinguir as cianobactérias das microalgas, pela presença da fluorescência da ficocianina. No entanto, como referido anteriormente, esta metodologia apresentou alguns resultados duvidosos que necessitaram de serem validados através de métodos moleculares.

Numa primeira abordagem utilizou-se o par de primers PC $\beta$ F/PC $\alpha$ R com o objetivo de amplificar, por PCR, e detetar o fragmento de 700 bp do operão responsável pela síntese do pigmento da ficocianina, comum a todas as cianobactérias. Este primeiro PCR serviu como controlo positivo para as análises seguintes, isto é, após confirmada a presença de cianobactérias através deste primeiro par de primers foi realizada uma segunda análise por PCR, de modo a determinar a presença de cianobactérias produtoras da cianotoxina, microcistina. Para isso, utilizou-se o par de primers *mcyA*\_CdF/*mcyA*\_CdR que amplifica a região de 300 bp, responsável por codificar um dos genes pertencentes ao *cluster* da biossíntese das microcistinas, o gene *mcyA*. Este gene encontra-se presente em várias espécies, já referidas como sendo produtoras desta toxina, nomeadamente espécies pertencentes a géneros como *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (Hisbergues *et al.* 2003)

### 3.2.1. Amostras ambientais

#### a. PCR ficocianina

De forma a corroborar os resultados obtidos na observação microscópica com fluorescência realizou-se o PCR para a deteção do operão que codifica a ficocianina.

Como se pode observar pela Figura 6, todas as amostras ambientais (Série 1) analisadas apresentaram o fragmento correspondente à presença do operão responsável pela produção da ficocianina (700 bp), exceto a amostra F. No entanto, tal como se observa no gel, nesta amostra foram amplificados outros fragmentos de menor massa molecular que deverão estar relacionados com amplificações inespecíficas deste par de primers.

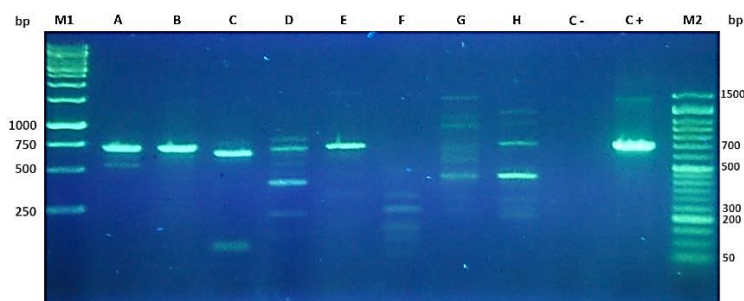


Figura 6 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão da ficocianina das amostras ambientais (Série 1: A,B, C, D, E, F, G e H). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

### b. PCR microcistina

Uma vez que todas as amostras ambientais, à exceção da amostra 1.F, apresentavam cianobactérias, procedeu-se ao passo seguinte da árvore de decisão (Figura 5), que consistiu em verificar se as cianobactérias detetadas apresentavam capacidade genética para produção de microcistinas.

Pela observação do gel da Figura 7, verificou-se que, à exceção da amostra 1.H, nenhuma das outras amostras ambientais analisadas neste estudo apresentou amplificação da região do gene responsável pela produção de microcistina (300 bp). Ainda assim, na amostra 1.H, a banda observada é bastante tênue, sugerindo semi-quantitativamente que a quantidade de DNA alvo será baixo.

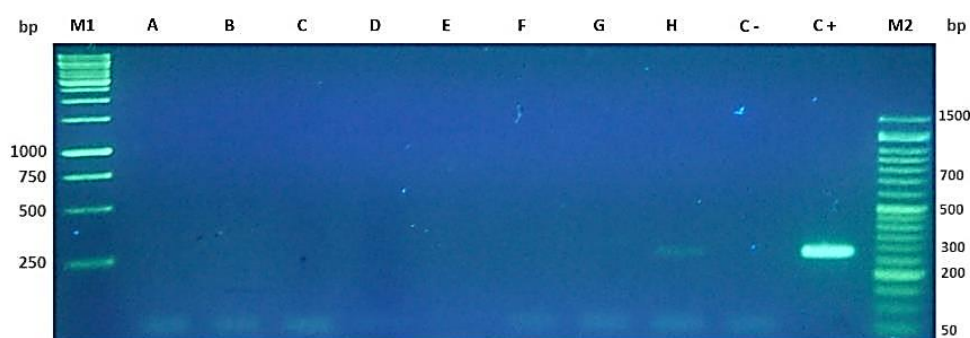


Figura 7 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina (*mcyA*) das amostras ambientais (Série 1: A,B,C,D,E,F,G, e H). Controlo positivo (C+) DNA da espécie *Microcystis aeruginosa* que apresenta banda nos 300 bp, e como controlo negativo (C-), água destilada. Os marcadores utilizados foram: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

Estes resultados sugerem que apesar de existirem cianobactérias nos ambientes analisados, estas não apresentam capacidade de produzir microcistina, com exceção da amostra H.

### 3.2.2. Amostras de culturas de microalgas em produção

As amostras de culturas de microalgas em produção foram analisadas no laboratório pois existiam dúvidas, a nível microscópico, em relação à presença de cianobactérias nestes cultivos.

#### a. PCR ficocianina

A Figura 8 mostra os resultados obtidos para a deteção do operão da ficocianina nas amostras de microalgas de produção (Série 2): uma de água doce (amostra A) e duas de água salgada (amostras B e C). Nas amostras de água salgada, não se observou nenhum fragmento correspondente ao operão de ficocianina (700 bp).

No caso da amostra 2.A, observou-se o fragmento a detetar (700 bp), e outros dois a 900 e 500 bp, possivelmente devido à ocorrência de amplificações inespecíficas. Este resultado não está em concordância com a observação microscópica com fluorescência, onde não se observou nenhuma fluorescência indicativa da presença de cianobactéria.



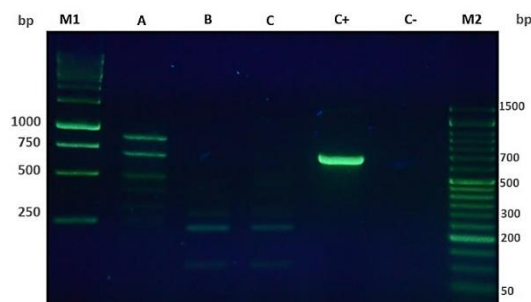


Figura 8 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operon da ficocianina das amostras de culturas de microalgas (Série 2: A,B e C). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

Pela observação do gel de agarose da amostra 2.D (cultura de microalgas de água salgada) apresentado na Figura 9, verificou-se que, tal como nas outras duas amostras de água salgada anteriormente analisadas, não houve amplificação positiva do fragmento correspondente ao operon da ficocianina (700 bp). No entanto, ocorreu a amplificação de dois outros fragmentos (300 e 1100 bp). Tal como aconteceu nas outras amostras, anteriormente apresentadas, a presença de outras bandas pode, possivelmente, corresponder a amplificações inespecíficas.

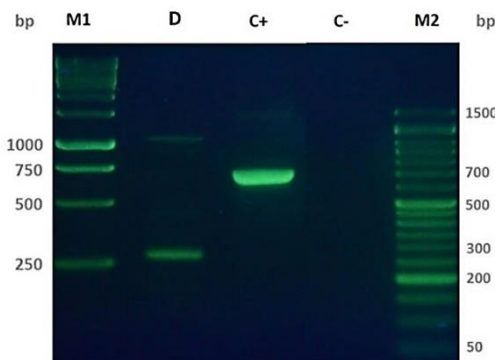


Figura 9- Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operon da ficocianina das amostras de culturas de microalgas (Série 2: D). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

Relativamente às amostras 2.E e 2,F verificou-se (Figura 10) a presença do fragmento indicador da ficocianina (700 bp). Em ambas as amostras observaram-se outras bandas que, possivelmente, resultaram de amplificações inespecíficas. No caso da amostra 2.E detetaram-se fragmentos com 1200, 1000, 400 e 300 bp e na amostra F com 800 e 250 bp.

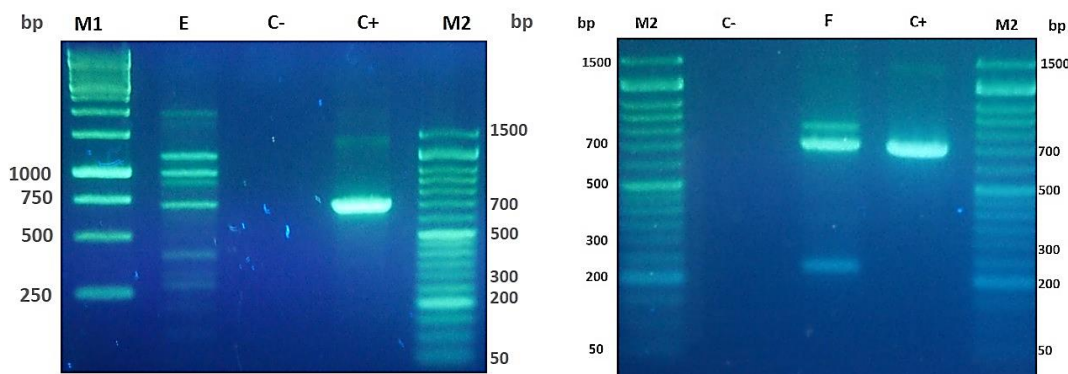


Figura 10 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operon da ficocianina das amostras de culturas de microalgas (Série 2: E e F). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

## b. PCR microcistina

Tal como aconteceu nas amostras ambientais (Série 1), as amostras de microalgas em produção foi, também, necessário analisá-las para detetar a presença do gene da microcistina visto que se obteve resultado positivo para a presença de cianobactérias.

Pela observação da Figura 11 verificou-se que na amostra 2.A, as cianobactérias presentes não apresentam capacidade de produção de microcistinas pois não se detetou nenhuma fragmento correspondente ao gene da microcistina. Os resultados das amostras 2.B, 2.C e 2.D foram negativos para microcistina, o que era esperado visto que a deteção de cianobactérias por PCR foi igualmente negativa.

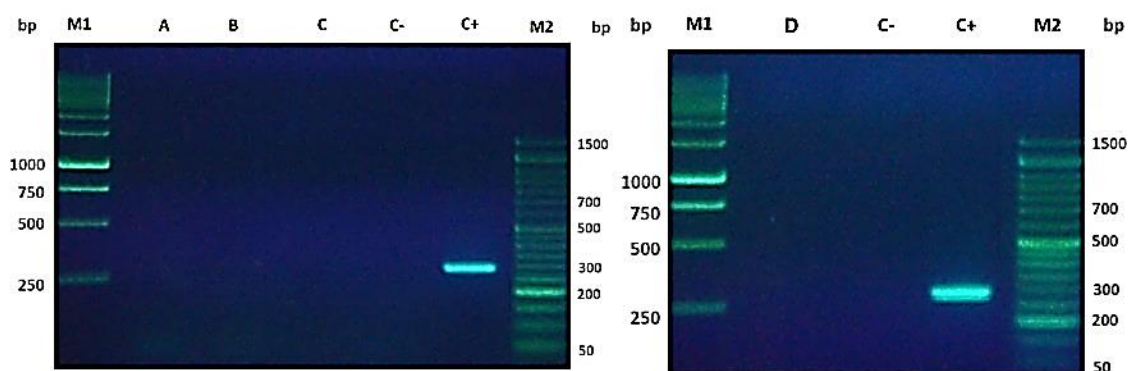


Figura 11 - Imagem fotográfica dos géis de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina (*mcyA*) das amostras de culturas de microalgas (Série 2: A,B, C e D). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da espécie *Microcystis aeruginosa* (300 bp); Controlo negativo (C-), água de PCR. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

Pela análise da Figura 12 verificou-se que as cianobactérias detetadas, nas amostras 2.E e 2.F, não detêm o gene responsável pela produção da cianotoxinas em análise (microcistina). No caso da amostra F, observou-se uma banda a 700 bp que, tal como anteriormente referido, poderá estar relacionado com amplificações inespecíficas.

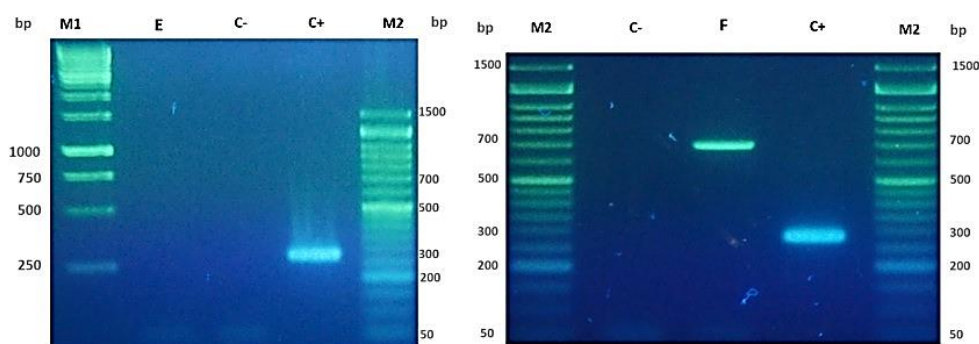


Figura 12 - Imagem fotográfica dos géis de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina (*mcyA*) das amostras de culturas de microalgas (Série 2: E e F). Controlo positivo (C+) DNA da espécie *Microcystis aeruginosa* (300 bp), Controlo negativo (C-), água destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

### 3.2.3. Amostras liofilizadas (produto final)

#### a. PCR ficocianina

Pela observação da Figura 13, as amostras liofilizadas que apresentaram amplificação positiva para o operon da ficocianina (700 bp) foram 3.A e 3.E. O resultado obtido na amostra 3.A não foi concordante com a observação microscópica visto que não apresentou fluorescência. No caso da amostra 3.E, este resultado está de acordo com a fluorescência observada ao microscópio.

Na amostra 3.B verificou-se uma banda nos 800 bp, que contraria o resultado da observação microscópica onde a fluorescência bastante intensa observada poderá representar um falso positivo.

No caso da amostra 3.C e 3.F não se observou nenhuma banda e no caso da amostra 3.D, o fragmento amplificado tem dimensão superior, em cerca de 50 bp, relativamente ao controlo positivo. Estes resultados mostraram total concordância com os resultados das observações com fluorescência.

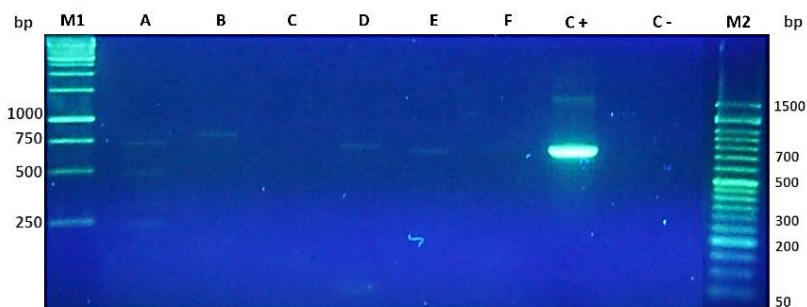


Figura 13 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operon da ficocianina das amostras liofilizadas (Série 3: A,B, C, D, E e F). Controlo positivo (C+) utilizou-se o DNA da estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 (700 bp); Controlo negativo (C-), água de destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).

#### b. PCR microcistina

Para a deteção do gene responsável pela produção da microcistina analisaram-se apenas as amostras liofilizadas que apresentaram resultado positivo para a ficocianina (amostra 3.A e 3.E). Nestas amostras, não foram observadas nenhuma amplificações, como se pode verificar pela Figura 14, indicando que as cianobactérias detetadas pelo PCR anterior, não têm capacidade a nível genético para produzir microcistinas.

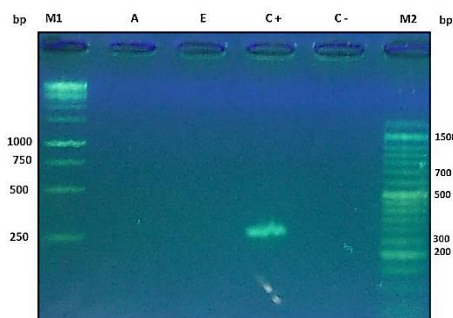


Figura 14 - Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o gene da microcistina (*mcyA*) das amostras liofilizadas (Série 3: A e E). Controlo positivo (C+) DNA da espécie *Microcystis aeruginosa* (300 bp), Controlo negativo (C-), água destilada. Marcadores: M1 - Ladder 1 kb (Thermoscientific); M2 - Ladder VI (NZYTech).



### 3.3.Determinação do limite de detecção da observação microscópica e da amplificação por PCR

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos na contagem celular das cinco suspensões obtidas por diluições decimais sucessivas de uma cultura de *Synechocystis* sp. e preparadas para determinação do limite de detecção. No caso da diluição 5 (correspondendo a  $10^4$  cél/mL) não foi possível aplicar a contagem celular, por não se observar células na câmara de Neubauer.

Tabela 12 – Contagem celular das cinco suspensões preparadas a partir de um inóculo puro de *Synechocystis* sp. PCC6803. ND – Não determinado

Diluição	Média de células contadas	Cél/mL	Coefficiente de Variação (%)
1	318	$4,2 \times 10^8$	4,9
2	626,3	$3,1 \times 10^7$	4,0
3	247,6	$2,5 \times 10^6$	8,9
4	16,3	$1,6 \times 10^5$	30,2
5	ND		

A Figura 15 mostra os resultados obtidos para a detecção do operão da ficocianina nas cinco concentrações celulares por PCR. O fragmento correspondente ao operão alvo (700 bp) foi detetado em todas as concentrações.

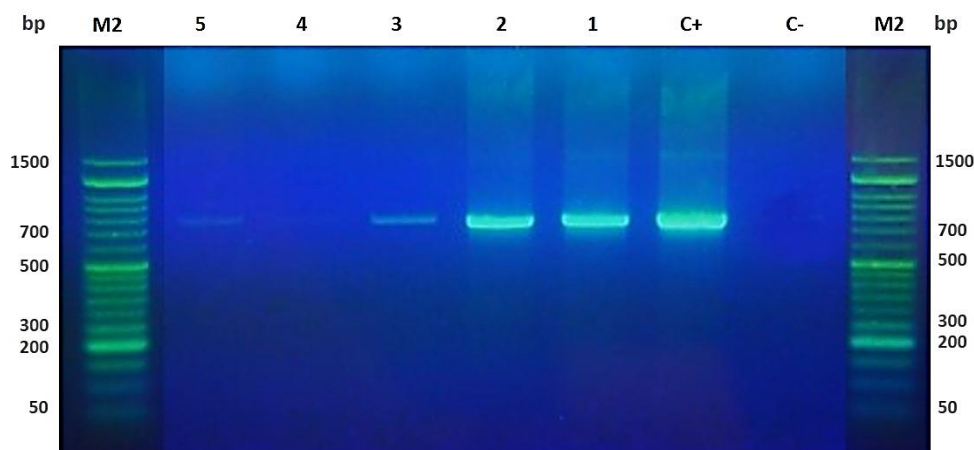


Figura 15 – Imagem fotográfica do gel de agarose 2%, utilizando os produtos de amplificação para o operão de ficocianina em cinco amostras obtidas por diluições sucessivas a partir de uma cultura pura de *Synechocystis* sp.PCC6803. Controlo positivo (C+) DNA da espécie *Synechocystis* sp.PCC6803 (700 bp), Controlo negativo (C-), água destilada. Marcador: M2 - Ladder VI (NZYTech).

Na Tabela 13 indica-se o número de células a partir das quais foi realizada a extração de DNA de *Synechocystis* sp.PCC6803. Evidencia-se, igualmente, o número de células que correspondem ao DNA aplicado em gel de agarose.

Tabela 13 – Número de células usadas para extração de DNA e aplicadas em gel

Diluição	Cél/mL extração DNA	Nºcélulas (DNA aplicado em gel)
1	$2,10 \times 10^8$	$2,1 \times 10^5$
2	$1,55 \times 10^7$	$2,1 \times 10^4$
3	$1,25 \times 10^6$	$2,1 \times 10^3$
4	$8,00 \times 10^4$	210
5	$2,10 \times 10^4$	21

### 3.4.ELISA

O kit de ELISA utilizado neste trabalho foi desenhado apenas para analisar amostras aquosas e, portanto, amostras em estado sólido (pó) não puderam ser utilizadas nos ensaios com esta metodologia. Assim sendo, as amostras testadas foram apenas as amostras ambientais (Série 1) e duas amostras de culturas de microalgas em produção (Série 2), a amostra 2.E e 2.F ambas de água salgada. Nestas amostras não foi detetado o operão da microcistina, no entanto, decidiu-se analisar por ELISA, no sentido de melhor implementar este teste no laboratório. As restantes amostras da Série 2 não puderam ser analisadas pois na altura da sua receção, a metodologia de ELISA ainda não tinha sido implementada.

Os resultados foram calculados através da equação determinada pela recta de calibração (Figura 16). A Figura 17 mostra que todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de MC-LR residuais e inferiores ao valor legal de microcistina, 1 µg/L (1 ppb), emitido pela WHO.

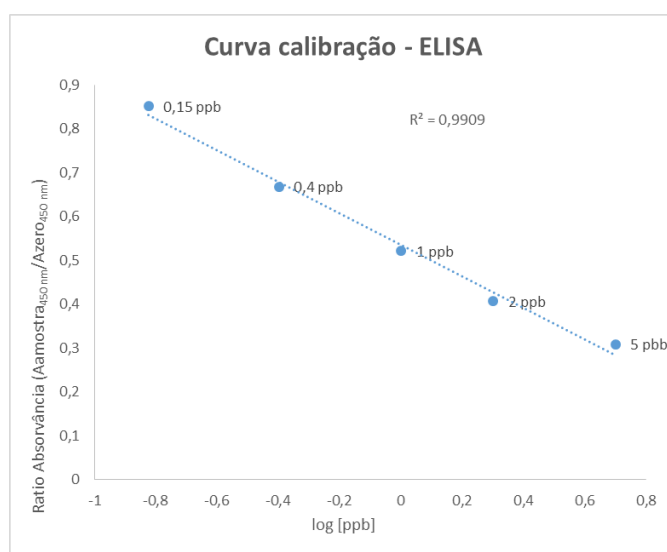


Figura 16 – Representação da reta de calibração obtida na análise de ELISA. Concentração no eixo horizontal: 0.15 a 5 ppb

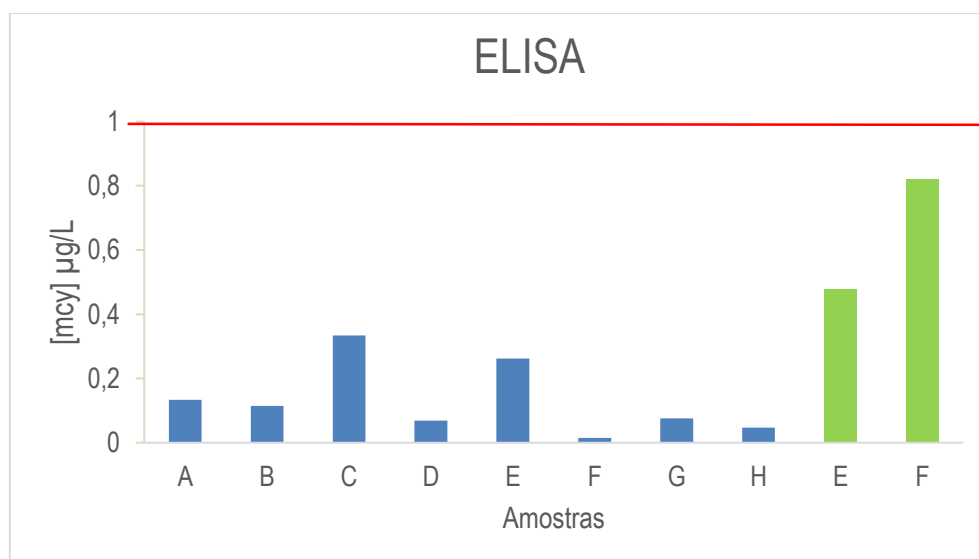


Figura 17 – Representação gráfica da análise de ELISA para as amostras ambientais (Série 1, Barras azuis) e para as amostras de culturas de microalgas em produção (Série 2, Barras verdes). A linha vermelha indica o limite legal (1 µg/L).

### 3.5. Sumário dos resultados

Na Tabela 14 apresenta-se a compilação dos resultados obtidos em cada uma das amostras estudadas neste trabalho, em cada uma das técnicas usadas: Microscopia de fluorescência, PCR para ficocianina e PCR para microcistina e ELISA.

Tabela 14 – Resultados obtidos nos diferentes métodos de análise deste estudo. O símbolo (+) é um resultado positivo. O símbolo (-) é um resultado negativo. ND – Não determinado

Série	Amostra	Método			
		Microscopia de fluorescência (presença ficocianina)	PCR (presença de ficocianina)	PCR (presença de microcistina)	ELISA (µg/L)
1	A	+	+	-	0,13
	B	+	+	-	0,11
	C	+	+	-	<b>0,33</b>
	D	+	+	-	0,07
	E	+	+	-	<b>0,26</b>
	F	-	-	-	0,01
	G	+	+	-	0,07
	H	+	+	+	0,04
2	A	-	+	-	ND
	B	-	-	-	ND
	C	-	-	-	ND
	D	-	-	-	ND
	E	+	+	-	<b>0,47</b>
	F	+	+	-	<b>0,82</b>
3	A	-	+	-	ND
	B	+	-	ND	ND
	C	-	-	ND	ND
	D	-	-	ND	ND
	E	+	+	-	ND
	F	-	-	ND	ND

---

## 4. Discussão e Conclusão

---

Neste trabalho pretendeu desenvolver-se um plano de diagnóstico para deteção de cianobactérias e possíveis toxinas por elas produzidas, no âmbito da monitorização de culturas de microalgas produzidas a nível industrial. Esta monitorização é uma tarefa fundamental no processo de produção de microalgas pois as cianobactérias são um dos contaminantes mais problemáticos, não só pelo fato de apresentarem uma taxa de reprodução bastante elevada mas, principalmente, pelo fato de existirem espécies produtoras de cianotoxinas. A monitorização torna-se ainda mais premente quando se trata de culturas direcionadas para o setor alimentar, nomeadamente para suplementos e ingredientes alimentares.

Como tal, este plano de diagnóstico resultou numa árvore de decisão (Figura 5) na qual se encontram inseridas metodologias de análise de diferentes áreas, entre as quais microscopia de fluorescência, PCR e ELISA. A combinação multidisciplinar dos métodos permitiu valorizar os pontos fortes de cada um, anulando as suas desvantagens de quando utilizados individualmente.

A microscopia ótica com fluorescência revelou vantagens em relação à microscopia ótica convencional (campo claro), mostrando ser bastante benéfico durante a observação microscópica das culturas. Esta técnica permite não só verificar as estruturas morfológicas características das cianobactérias mas, principalmente, possibilita detetar o pigmento que caracteriza estes microrganismos, a ficocianina, pela sua fluorescência de emissão (620 nm) que é diferente do espectro de emissão das clorofilas (660-685 nm, fluorescência máxima da clorofila), presente nas microalgas (Lichtenthaler *et al.*, 2001; Gregor *et al.*, 2007; Kasinak *et al.*, 2015). Este fato verifica-se nas observações microscópicas com fluorescência realizadas neste trabalho, como no caso dos controlos (Tabela 8), em que as duas espécies de microalgas utilizadas (*Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp.) não apresentaram uma fluorescência tão intensa e de cor laranja-avermelhada como na espécie de cianobactéria (*Synechocystis* sp.) na qual se observou a fluorescência característica da ficocianina. Este resultado foi também verificado nas amostras da Série 1 (amostras ambientais), da Tabela 9, que mostra, em campo claro, células com estruturas e coloração semelhantes às das cianobactérias e verificando-se fluorescência intensa nessas mesmas células. Este método mostrou ainda outra vantagem para os casos em que existem dúvidas na observação ótica em campo claro, como no caso das amostras 2.B e 2.C (amostras de culturas de microalgas em produção). Nestes casos existiam dúvidas acerca de umas células filamentosas que se assemelhavam a cianobactérias. No entanto, em microscopia com fluorescência, estas células não emitiam nenhum tipo de fluorescência, indicando assim a não presença de ficocianina, ou seja, cianobactérias.

No entanto, esta técnica de microscopia com fluorescência apresentou falsos negativos nas amostras 2.A (amostra de cultura de microalgas em produção) e 3.A (amostra liofilizada), bem como um falso positivo na amostra 3.B (amostra de cultura de microalgas de produção). No caso do falso positivo este pode ser explicado pelo fato do cubo de fluorescência utilizado ter capacidade de excitar entre os comprimentos de onda 540-550 nm (segundo manual do

forneceador do cubo), conseguindo assim excitar o espectro da clorofila e originando um falso resultado para a presença de cianobactérias (Gregor, 2007). Relativamente aos falsos negativos estes podem ser justificados pelos diferentes limites de detecção associados à observação microscópica e à técnica de PCR, apresentados na Tabela 12 e Figura 15.

O desenvolvimento de um método molecular para detecção de cianobactérias é essencial para haver uma resposta rápida e precisa sobre a presença ou ausência de cianobactérias nas amostras analisadas, principalmente quando se tratam de produtos alimentares. Neste trabalho, verificou-se que a utilização da técnica de PCR apresenta grandes vantagens para detecção de cianobactérias nomeadamente pelo fato de não necessitar de culturas puras ou axénicas, visto que se utilizam primers específicos para um determinado gene ou operão alvo, e ser uma técnica rápida e precisa.

Analisando a literatura, muitos trabalhos de detecção e monitorização de cianobactérias utilizam o gene 16S rRNA, por ser um gene partilhado por todas as cianobactérias (Valério *et al.*, 2010; Jungblut *et al.*, 2005; Neilan *et al.*, 1995), como alvo para amplificação, no entanto visto que grande maioria das amostras analisadas neste trabalho são amostras ambientais, ao amplificar a região 16S rRNA é expectável que haja amplificações de cianobactérias bem como de bactérias presentes nas amostras. Como tal, o primeiro par de primers utilizado foi PC $\beta$ / PC $\alpha$  (Fonseca *et al.*, 2011; Saker *et al.*, 2005a; Neilan *et al.*, 1995) com o objetivo de amplificar o fragmento de 700 bp correspondente ao operão da ficocianina que, tal como o gene 16S rRNA, é comum a todas as cianobactérias, excluindo as bactérias.

Relativamente aos resultados obtidos na reação de PCR com os primers para a amplificação do operão da ficocianina, estes mostraram a presença do fragmento de 700 bp em todas as amostras ambientais à exceção da amostra 1.F (Figura 6). Na amostra 1.G observou-se uma banda muito ténue, o que poderá estar relacionado com uma ineficiente extração de DNA visto que o resultado da observação com fluorescência mostrou uma intensa fluorescência, indicando deste modo uma evidente presença de cianobactérias nessa amostra. Assim, os resultados da amplificação do operão da ficocianina por PCR, das amostras da Série 1 (amostras ambientais), foram totalmente concordantes com os resultados observados por microscopia de fluorescência.

Em relação aos resultados das amplificações do operão da ficocianina para as amostras da Série 2 (culturas de microalgas em produção) verificou-se a presença de cianobactérias em 50% das amostras analisadas (Figura 8 à Figura 10). No caso da amostra 2.A observou-se a amplificação do fragmento correspondente ao operão da ficocianina no entanto, não se detetou fluorescência na observação microscópica, indicando não existir presença de cianobactérias. Esta não concordância de resultados poderá ser justificada pelo fato de a análise por PCR permitir detetar menor número de células, o que será discutido posteriormente.

Os resultados da reação de PCR para a amplificação do operão da ficocianina, em relação às amostras da Série 3 (amostras liofilizadas), mostraram que a maioria das amostras não apresenta cianobactérias, com exceção da amostra 3.A e 3.E. No caso da amostra 3.B, o resultado obtido por PCR não foi concordante com a observação microscópica com fluorescência. Tal como referido anteriormente, estes resultados podem indicar que o espectro de emissão da clorofila (pigmento predominante das microalgas) pode ser detetado no cubo de

fluorescência da ficocianina, com baixa intensidade, originando assim um falso positivo. A amostra 3.A também apresentou um resultado na microscopia diferente do resultado da análise molecular. Este caso é igual ao observado na amostra 2.A e é justificado pelo limite de detecção de ambas as técnicas.

Neste trabalho realizou-se um teste para determinar o limite de detecção da técnica de microscopia de fluorescência e da técnica de detecção por PCR. Pela análise dos dados apresentados na Tabela 12 verificou-se que a técnica de microscopia tem como limite a contagem de células na ordem  $\times 10^5$  cél/mL, contudo estas contagens celulares apresentaram um coeficiente de variação de 30,2%, impedindo o seu uso na análise. A Figura 15 mostra que o limite de detecção da técnica de PCR encontra-se na ordem  $\times 10^4$  cél/mL, que neste caso corresponde ao DNA de 21 células. Tal como seria de esperar, pela observação do gel verifica-se que intensidade das bandas diminui à medida que a concentração celular diminui, com a exceção da correspondente a  $\times 10^5$  cél/mL em que a amplificação do fragmento do operão da ficocianina é menos intenso do que a  $\times 10^4$  cél/mL. Este fato poderá dever-se a um erro de amostragem durante o processo de extração do DNA.

Conclui-se assim que análise molecular (PCR) apresenta um maior limite de detecção, e por conseguinte, uma maior sensibilidade para detetar a presença de cianobactérias, do que a observação microscópica. Outros trabalhos publicados para detecção de microrganismos verificaram, também, que a técnica de microscopia é menos sensível e específica do que a análise por PCR (Morgan *et al.*, 1998; Toze, S., 1999). Contudo, a técnica de microscopia é útil devido à sua rapidez de execução.

No processo de produção de microalgas para o setor alimentar, a observação microscópica com fluorescência e a amplificação do operão da ficocianina, por PCR, não são suficientes para garantir a não existência de cianotoxinas e assegurar a qualidade que as normas de segurança alimentar exigem. O fato é que a existência de cianobactérias nas amostras não está relacionada diretamente com a presença de cianotoxinas nas culturas de microalgas e no produto final. Existem ainda casos de cianobactérias pertencentes ao mesmo género que apresentam estirpes fenotipicamente idênticas mas genotipicamente diferentes a nível de toxicidade, sendo umas tóxicas e outras não tóxicas (Rantala *et al.*, 2006; Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011).

Por esta razão, durante a elaboração da árvore de decisão (Figura 5), foi adicionada a terceira análise que corresponde à detecção, por PCR, do gene responsável pela síntese de uma cianotoxina, a microcistina (MC). Para tal, utilizou-se o par de primers mcyA\_CdF/mcyA\_CdR. Neste estudo foi apenas analisada esta cianotoxina pois, até à data, é a única que se encontra regulamentada pela WHO. Esta entidade emitiu um valor guia para a concentração de microcistinas-LR na água de consumo humano de 1 µg/L (World Health Organization, 2004).

Em relação aos resultados obtidos na reação de PCR com o primer da microcistina, estes mostraram que todas as amostras analisadas neste trabalho não apresentavam gene da cianotoxina, à exceção da amostra 1.H. Pela observação do gel de agarose (Figura 7), verifica-se na amostra 1.H a banda, ainda que com fraca intensidade, correspondente à presença do gene de microcistina. Este resultado poderá indicar que a concentração de cianobactérias com potencial tóxico é baixa ou, segundo Toze, S (1999), compostos húmicos, normalmente

presentes nas amostras ambientais, afetaram a eficiência da extração de DNA. O fato de se observar cianobactérias geneticamente tóxicas não é indicativo que ocorra produção de toxinas. Outros estudos demonstraram que diferentes fatores externos, tais como intensidade luminosa, nutrientes, entre outros, estão relacionados com a produção de cianotoxinas (Kaebernick *et al.*, 2001; Rantala *et al.*, 2006; Rinta-Kanto *et al.*, 2009).

Todas as técnicas referidas até ao momento permitiram realizar uma análise qualitativa das amostras em estudo. Seguindo a ordem da árvore de decisão (Figura 5), utilizou-se uma análise imunológica (ELISA) que permitiu avaliar quantitativamente a presença ou ausência de microcistinas nas amostras. Pela observação da curva de calibração (Figura 16) verifica-se que há uma relação direta entre a diminuição da absorvância e um aumento da concentração de microcistina. A análise das amostras (Figura 17) permitiu verificar que todas se encontram abaixo do limite legalizado para a microcistina, 1 µg/L (1 ppb).

No caso da amostra 1.H pode concluir-se que as cianobactérias, presentes na amostra do fotobioreactor, não expressaram o gene *mcyA*. A observação por microscopia de fluorescência (Tabela 9) e amplificação do operão da ficocianina (Figura 6) revelaram presença de cianobactérias. Igualmente comprovou-se que a amostra apresentava cianobactérias produtoras de microcistina pela deteção da banda correspondente ao gene da microcistina (Figura 7).

Nas amostras 1.C, 1.E, 2.E e 2.F quantificaram-se, 0,33, 0,26, 0,47, 0,82 µg/L de microcistinas, respetivamente. Estes valores não estão de acordo com os dados obtidos por PCR que apontam para a ausência do gene da cianotoxina. Estes resultados podem ser justificados segundo Metcalf e colaboradores (2000), que mostraram a interferência de diversos fatores, nomeadamente da salinidade e pH. Recordando que as amostras E e F, da Série 2, foram amostras de culturas de microalgas de água salgada, e que apresentaram os valores mais elevados de MC, na análise de ELISA, podemos sugerir que existe algum nível de interferência da água salgada, resultando nos valores relativamente altos registados. Em relação às duas amostras da Série 1, C e E, ambas de ambientes de água doce, poderá estar relacionado com o limite de deteção do kit ser superior ao do método molecular (referente ao par de primers para *mcy*) (Pan *et al.*, 2002). Pode ainda estar relacionado com a presença de outras cianotoxinas que não foram estudadas neste trabalho mas que este kit deteta, as nodularinas.

A Tabela 14 é uma compilação dos resultados obtidos em cada uma das metodologias de análise utilizadas neste estudo, que comprova que a multidisciplinidade destas técnicas permitiu obter resultados sólidos e fidedignos, segundo a árvore de decisão (Figura 5). Esta árvore provou ser uma ferramenta robusta para a monitorização de culturas de microalgas na deteção de cianobactérias e cianotoxinas.

Como conclusões finais, neste trabalho foi possível verificar que a análise microscópica com fluorescência é muito útil pois a informação fornecida permite determinar qual o tipo de metodologia que se deve realizar de seguida. No caso do método molecular usado neste trabalho, PCR, possibilitou detetar de uma forma rápida a presença de cianobactérias e, caso estas fossem detetadas, se eram potencialmente tóxicas ou não. Conclui-se também, que o método molecular é mais sensível que a observação microscópica. No caso da técnica de ELISA,



além de rápida, mostrou ser sensível. Contudo apresenta algumas limitações, nomeadamente na interferência da salinidade e, ainda, por não analisar amostras sólidas.

Durante o desenvolvimento deste estudo surgiram algumas questões que se tornaram ações futuras, na continuação deste trabalho. Um dos casos é o aparecimento de bandas inespecíficas, nas amplificações por PCR, pois os primers foram utilizados em amplificações de PCR pouco restritivas, nomeadamente a temperatura de *annealing* baixa. Este fator facilita o emparelhamento inespecífico, mas também aumenta o alcance dos primers para genes ligeiramente diferentes. Assim, pretende-se reavaliar as condições do PCR de forma a obter um produto mais específico, nomeadamente, a temperatura e o tempo de *annealing* e a quantidade de DNA e/ou primers.

Outro ponto a ser desenvolvido e com elevada importância é a utilização de controlos internos nas análises por PCR visto que este trabalho tem por base um plano de diagnóstico. A utilização de controlos internos é fundamental para provar o correto funcionamento dos métodos moleculares fornecendo uma maior robustez e veracidade aos resultados. E por fim, como trabalho futuro, otimizar o método de quantificação de microcistinas para amostras em estado sólido (pó) e de água salgada.

O problema das cianotoxinas nas águas Portuguesas é relevante. Esta questão tem a ver com a legislação das cianotoxinas. A atual legislação portuguesa tem referenciado o valor guia de MC-LR, para águas de consumo humano, emitida pela WHO (WHO, 2004) com um limite recomendado de 1 µg de MC-LR por litro. Contudo, esta legislação não elimina ou diminui a perigosidade das restantes cianotoxinas existentes, e igualmente perigosas, que já foram detetados em Portugal (Rawn *et al.*, 2007; Vasconcelos, 2007; Vasconcelos, 2006) (Tabela 1) que podem causar graves problemas a nível de saúde pública. Além disso, esta legislação não se deveria apenas restringir às águas de consumo mas também deveria abranger o sector alimentar (Saker *et al.*, 2005a; Saket *et al.*, 2007; Rellán *et al.*, 2009) onde existem cada vez mais produtos passíveis de apresentar essas toxinas sem que haja legislação.

---

## 5. Referências bibliográficas

---

- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006).** Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC press. Página 16, 17 e 18.
- Bittencourt-Oliveira, M. C., Oliveira, M. C., & Pinto, E. (2011).** Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Brazilian Journal of Biology*, 71 (1), 209-216.
- Chorus, E. I., & Bartram, J. (1999).** Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.
- Chu, F. S., Huang, X. U. A. N., Wei, R. D., & Carmichael, W. W. (1989).** Production and characterization of antibodies against microcystins. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (8), 1928-1933.
- Churro, C., Valério, E., & Dias, E. (2012).** Risk assessment of cyanobacteria and cyanotoxins, the particularities and challenges of *Planktothrix* spp. monitoring. INTECH Open Access Publisher.
- Ferreira, F. M., Soler, J. M. F., Fidalgo, M. L., & Fernández-Vila, P. (2000).** PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon*, 39 (6), 757-761.
- Figueiredo, D. R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonçalves, F. J., & Pereira, M. J. (2004).** Microcystin-producing blooms - a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59 (2), 151-163.
- Fonseca, I. A., Maniglia, T. C., Rodrigues, L., Prioli, A. J., & Prioli, S. M. A. P. (2011).** Identificação do gene *mcyA* em florações naturais de *Radiocystis fernandoi*, em um tributário do reservatório de Rosana, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 33 (3), 319-324
- Frazão, B., Martins, R., & Vasconcelos, V. (2010).** Are known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous North Atlantic marine cyanobacteria? *Marine Drugs*, 8 (6), 1908-1919.
- Gregor, J., Maršálek, B., & Šípková, H. (2007).** Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method. *Water Research*, 41(1), 228-234.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., & Börner, T. (2003).** PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, 180 (6), 402-410.
- Hunter, P. R. (1998).** Cyanobacterial toxins and human health. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (1), 35-40.
- Jungblut, A. D., & Neilan, B. A. (2006).** Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology*, 185 (2), 107-114.
- Kaebernick, M., & Neilan, B. A. (2001).** Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(1), 1-9.
- Kasinak, J. M. E., Holt, B. M., Chislock, M. F., & Wilson, A. E. (2015).** Benchtop fluorometry of phycocyanin as a rapid approach for estimating cyanobacterial biovolume. *Journal of Plankton Research*, 37(1), 248-257.
- Kotai, J. (1972).** Instructions for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae. Norwegian Institute for Water Research B-11769: Blindern, Oslo, Norway, p. 5.

- Lee, T. H., & Chou, H. N. (2000).** Isolation and identification of seven microcystins from a cultured M. TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41.
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001).** Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L., & Sivonen, K. (2001).** Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (2), 513-526.
- Manen, J. F., & Falquet, J. (2002).** The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52 (3), 861-867.
- Metcalfe, J. S., Hyenstrand, P., Beattie, K. A., & Codd, G. A. (2000).** Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 532-538.
- Moreira, C., Martins, A., Moreira, C., & Vasconcelos, V. (2011).** Toxigenic Cyanobacteria in volcanic lakes and hot springs of a North Atlantic Island (S. Miguel, Azores, Portugal). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2).
- Moreira, C., Ramos, V., Azevedo, J., & Vasconcelos, V. (2014).** Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (19), 8073-8082.
- Moreno, I. M., Pereira, P., Franca, S., & Camean, A. (2004).** Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (southwestern Spain). *Biological Research*, 37 (3), 405-417.
- Morgan, F. U., Pallant, L., Dwyer, B. W., Forbes, D. A., Rich, G., & Thompson, R. C. A. (1998).** Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 995-998.
- Neilan, B. A., Jacobs, D., & Goodman, A. E. (1995).** Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11), 3875-3883.
- Oliveira, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G., & Leite, S. G. F. (1999).** Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, 7(4), 261-275.
- Pan, H., Song, L., Liu, Y., & Börner, T. (2002).** Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Archives of microbiology*, 178(6), 421-427.
- Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N., & Oshima, Y. (2000).** Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*, 38 (12), 1689-1702.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., & Sivonen, K. (2006).** Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6101-6110.
- Relán, S., Osswald, J., Saker, M., Gago-Martinez, A., & Vasconcelos, V. (2009).** First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food and chemical toxicology*, 47(9), 2189-2195.
- Rinta-Kanto, J. M., Saxton, M. A., DeBruyn, J. M., Smith, J. L., Marvin, C. H., Krieger, K. A., Sayler, G. S., Boyer, G. L., Wilhelm, S. W. (2009).** The diversity and distribution of toxigenic *Microcystis* spp. in present day and archived pelagic and sediment samples from Lake Erie. *Harmful Algae*, 8(3), 385-394.

- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., & Lahti, K. (2002).** Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography – UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta*, 466 (2), 213-231.
- Rawn, D. F., Niedzwiadek, B., Lau, B. P. Y., & Saker, M. (2007).** Anatoxin-a and its metabolites in blue-green algae food supplements from Canada and Portugal. *Journal of Food Protection*®, 70(3), 776-779.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F., & Jakobsen, K. S. (1997).** Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7), 2593-2599.
- Runnegar, M. T., Gerdes, R. G., & Falconer, I. R. (1991).** The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon*, 29 (1), 43-51.
- Saker, M. L., Nogueira, I. C., Vasconcelos, V. M., Neilan, B. A., Eaglesham, G. K., & Pereira, P. (2003a).** First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 (2), 243-250.
- Saker, M. L., Nogueira, I. C., & Vasconcelos, V. M. (2003b).** Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) in Portuguese freshwaters. *Limnetica*, 22 (3), 129-136.
- Saker, M. L., Fastner, J., Dittmann, E., Christiansen, G., & Vasconcelos, V. M. (2005).** Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (4), 749-757.
- Saker, M. L., Jungblut, A. D., Neilan, B. A., Rawn, D. F., & Vasconcelos, V. M. (2005a).** Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon*, 46 (5), 555-562.
- Saker, M. L., Welker, M., & Vasconcelos, V. M. (2007).** Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(5), 1136-1142.
- Toze, S. (1999).** PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*, 33(17), 3545-3556.
- Tsuji, T., Ohki, K., & Fujita, Y. (1986).** Determination of photosynthetic pigment composition in an individual phytoplankton cell in seas and lakes using fluorescence microscopy; properties of the fluorescence emitted from picophytoplankton cells. *Marine Biology*, 93 (3), 343-349.
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., & Tenreiro, R. (2010).** Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. *Environmental toxicology*, 25(3), 251-260.
- Vasconcelos, V. (1994).** **Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters.** Special Publications of the Royal Society of Chemistry, 149, 133-135.
- Vasconcelos, V. M. (1995).** Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 32 (2), 227-237.
- Vasconcelos, V. M., Sivonen, K., Evans, W. R., Carmichael, W. W., & Namikoshi, M. (1996).** Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Water Research*, 30 (10), 2377-2384.
- Vasconcelos, V. M. (1999).** Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32 (3), 249-254.
- Vasconcelos, V. M. (2006).** Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25 (1), 425-432.

**World Health Organization. (2004).** Guidelines for drinking-water quality: recommendations (Vol. 1). World Health Organization.

**Zanchett, G., & Oliveira-Filho, E. C. (2013).** Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins*, 5 (10), 1896-1917.